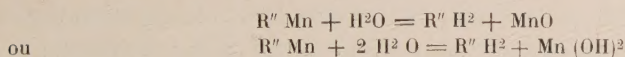


ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

Recherche sur l'influence paralysante exercée par certains acides sur la laccase

PAR M. GABRIEL BERTRAND.

Les expériences que j'ai publiées en 1897 sur le rôle du manganèse dans les phénomènes d'oxydation provoqués par la laccase¹ conduisent à envisager ce ferment soluble comme une combinaison métallique facilement hydrolysable, une sorte de sel se dédoublant par l'action de l'eau, d'une part, en un corps organique comparable à un acide faible, de l'autre, en oxyde ou plutôt en hydroxyde manganoux :



Cette conception laisse prévoir que les acides doivent, en général, intervenir d'une manière défavorable sur le processus oxydant de la laccase. Il est clair, en effet, qu'un corps électro-négatif d'énergie supérieure au complexe $\text{R}'' \text{ H}^2$ doit déplacer celui-ci et donner, en s'emparant du manganèse, un système moins facilement hydrolysable, moins apte par conséquent à entrer en jeu dans la série catalytique de réactions dont mes expériences ont établi la probabilité. Bien plus, comme l'activité du complexe $\text{R}'' \text{ H}^2$ est sans doute très faible, la sensibilité de la laccase aux acides doit être très grande.

L'expérience montre qu'il en est réellement ainsi, qu'une quantité extraordinairement petite de certains acides suffit pour entraver et même annuler complètement l'action de la laccase.

1. *Compt. rend. Ac. Sc.*, t. CXXIV, p. 1032 et p. 1355 (1897).

Je me suis servi, comme réaction d'épreuve, de la transformation du gayacol en tétragayacoquinone¹. A 5 c. c. de solution aqueuse de gayacol à 2 0/0, on ajoutait des quantités connues d'acide et de laccase et on complétait avec de l'eau le volume de 10 c. c. Les tubes étaient ensuite abandonnés à eux-mêmes, à la température ordinaire (+ 22 à + 23°). Quand il y avait oxydation diastasique, on voyait les mélanges, incolores et limpides comme de l'eau, se colorer successivement en rose, puis en rouge grenadine, commencer à se troubler en passant au rouge pourpre et laisser déposer une poudre microcristalline de même couleur.

La laccase provenait du latex de l'arbre à laque du Tonkin (*Rhus succedanea* Linné fils). Elle était très active car 1/250000^e, c'est-à-dire 0 gr., 00004 dans 10 c. c., donnait en 24 heures une coloration rose très nette à la solution de gayacol au centième. Avec une dose de 1/4000, la coloration apparaissait dans un intervalle de 5 à 10 minutes et la tétragayacoquinone commençait à se déposer après 1 heure 1/2 environ.

J'ai effectué un grand nombre d'expériences avec divers acides. Je donnerai d'abord les résultats que j'ai obtenus avec l'acide sulfurique.

Une quantité de cet acide correspondant à la dilution d'une demi-molécule-gramme dans 1000 litres d'eau (1/1000 normale ou N/1000)² arrête l'action oxydante de la laccase au 1/2000 ; il ne se fait pas de tétragayacoquinone et, malgré une attente de 24 heures, le mélange reste incolore et limpide.

Si on prend une plus petite proportion de laccase, l'arrêt de l'oxydation se produit avec moins d'acide. Il suffit d'une dilution 1/2000 normale (N/2000) pour arrêter l'action de la laccase au 1/4000 ;

D'une dilution 1/10000 normale si la laccase est au 1/20,000 ;

D'une dilution 1/20000 normale si la laccase est au 1/40,000 ;

1. G. BERTRAND, *Compt. rend. Ac. Sc.*, t. CXXXVII, p. 1269 (1903), et *Ann. Inst. Pasteur*, t. XVIII, p. 416 (1904).

2. $\text{SO}_4 \text{ H}_2$ bibasique ayant pour poids moléculaire 98, on obtient une solution normale, N/1, en diluant 98 : 2 = 49 gr. dans 1 litre d'eau.

D'une dilution $1/60000$ normale si la laccase est au $1/200,000$ ¹.

Les quantités d'acide sulfurique qui, sans arrêter aussi complètement l'action du ferment soluble, l'entravent d'une manière appréciable, sont beaucoup plus petites. J'ai trouvé, avec une solution de laccase au $1/10,000$ dans le gayacol à $10/0$, que l'acide sulfurique est encore nettement actif à l'incroyable dilution d'une demi-molécule-gramme dans $500,000$ litres, c'est-à-dire à la dilution absolue de $1/100,000,000$ environ.

Si l'on se souvient qu'à l'aide du papier de tournesol, cependant si sensible quand il est bien préparé, on décèle à peine l'acide sulfurique libre à la dilution $N/1000$ et plus du tout à la dilution double, on peut apprécier combien la laccase dépasse en sensibilité les meilleurs réactifs de la chimie.

Les expériences aux grandes dilutions sont assez délicates; elles ne réussissent régulièrement qu'à la condition de prendre des précautions particulières. Il faut opérer avec du matériel très soigneusement nettoyé et employer dans les mesures des quantités de liquides qui ne soient pas trop petites.

J'ai obtenu de très bons résultats en opérant de la manière suivante. La verrerie, bien lavée d'abord à la manière ordinaire, était finalement passée à l'acide acétique au 100° , puis rincée à fond, 5 ou 6 fois, avec de l'eau pure, égouttée et séchée. L'eau pure employée pour les derniers lavages et pour la préparation de toutes les liqueurs était préparée en redistillant de la bonne eau distillée dans le vide, avec un appareil muni d'un réfrigérant en argent.

Quant aux liqueurs titrées d'acides, on les obtenait par des dilutions successives, au $1/10$, en préparant au moins 200 c. c. à chaque dilution.

Pour les déterminations colorimétriques, on a opéré les mélanges de gayacol, d'acide et de laccase, non pas dans des tubes, qui eussent présenté une trop petite surface de contact avec l'air par rapport au volume du liquide, mais dans des vases cylindriques de 5 centimètres de diamètre. En agissant

1. Il est vraisemblable que la solubilité des alcalis du verre suffit à saturer la plus grande partie de l'acide sulfurique ajouté lorsqu'on opère à de très grandes dilutions. Ainsi s'expliquerait la moindre sensibilité relative de la laccase aux acides dans le dernier mélange.

sur 20 c. c., et en agitant souvent, on assurait une oxygénation des liquides aussi satisfaisante que possible.

Voici les résultats de deux séries d'expériences effectuées, la première, à la température de + 22°, la seconde à la température de + 23°. Les examens au colorimètre ont eu lieu après 5 heures de contact. Les chiffres expriment les intensités des colorations, c'est-à-dire les quantités relatives d'oxygène fixé à l'état de tétragaquinoone.

ACIDITÉ en acide normal.	PROPORTION de laccase.	1 ^{re} SÉRIE d'expériences.	2 ^e SÉRIE d'expériences.
0	1	100	100
	10.000		
1	—	»	90,9
<u>500.000</u>	—	»	75,2
1	—		
<u>400.000</u>	—	73,4	60,4
1	—		
<u>200.000</u>	—	48,8	»
1	—		
<u>100.000</u>	—	20,3	»
1	—		
<u>50.000</u>	—		

J'aurais pu essayer une dilution plus grande encore, telle que 1/1.000.000 de normale : l'effet eût certainement été mesurable, mais j'ai pensé qu'il valait mieux, au point de vue démonstratif, m'en tenir à des résultats tout à fait en dehors des erreurs expérimentales. Comme il n'est pas possible de se tromper de 9 0/0 dans une détermination colorimétrique portant sur une couleur rouge, l'influence paralysante de l'acide sulfurique sur la laccase, à l'extraordinaire dilution que j'ai indiquée, est indubitable.

Après avoir étudié l'action de l'acide sulfurique sur la laccase, il était tout indiqué d'examiner comparativement l'action d'autres acides. J'ai choisi, dans ce but, des représentants, soit minéraux, soit organiques, des groupes d'acides mono, bi et tri-basiques. J'ai fait réagir ces divers acides sur la laccase au 1/4000, à des dilutions variées, en général N/500, N/1000, N/2.000 N/5.000 et N/10000, le volume des mélanges étant chaque fois de 10 c. c. et renfermant un 100^e de gayacol. La marche de la réaction a été notée après 1 heure, après 5 heures et après 24 heures, mais, pour ne pas allonger inu-

tilement la liste des résultats, je donnerai seulement l'état des mélanges après la dernière observation. Température des expériences : + 22 à + 23°.

Acides monobasiques. — Ils comprennent : un acide minéral l'acide chlorhydrique ; trois acides de la série grasse en $C^n H^{2n} O^2$, l'acide formique, l'acide acétique et l'acide butyrique normal ; un acide aromatique, l'acide benzoïque, et un acide alcool, l'acide lactique.

Tous ces acides arrêtent totalement l'oxydation à la dilution N/1000 et à peu près totalement déjà à la dilution N.2000. Dans la série des trois acides : formique, acétique et butyrique normal, c'est le dernier qui s'est montré le moins actif et, après lui, l'acide acétique ; il y avait un faible précipité de tétragayacoquinone, après 24 heures, avec l'acide en C^4 , un commencement de précipité avec celui en C^2 . Avec les autres acides : aucune coloration ou seulement une très faible coloration.

Acides bibasiques. J'ai pris les acides sulfurique, oxalique et tartrique. Ces acides paralysent totalement l'action de la laccase à partir de la dilution N/2000, c'est-à-dire d'une demi-molécule-gramme dans 2,000 litres. Les deux hydrogènes fonctionnels y possèdent donc la même activité que l'hydrogène fonctionnel des acides monobasiques examinés plus haut.

L'acide oxalique s'est montré un peu plus énergique que les acides sulfurique et tartrique. Tandis qu'à la dilution N/5,000 il y avait, après 24 heures, un précipité de tétragayacoquinone avec l'acide sulfurique, un commencement de précipitation avec l'acide tartrique, il n'y avait qu'une faible coloration avec l'acide oxalique.

Acides tribasiques. — J'ai examinés les acides borique, phosphorique, arsénique et citrique. Ils ont donné des résultats assez inattendus. Au lieu d'agir, comparativement aux autres acides, à la dose d'un tiers de molécule-gramme, il a fallu employer l'acide citrique à la dose d'une demi-molécule, les acides phosphorique et arsénique à celle d'une molécule entière. Quant à l'acide borique, il s'est montré pour ainsi dire, inactif.

L'acide phosphorique et l'acide arsénique ne renfermeraient donc qu'un seul atome d'hydrogène actif, comparable à celui de

l'acide chlorhydrique ou de l'acide formique. A la dilution d'une molécule-gramme dans 2,000 litres, il arrête totalement l'action de la laccase; à celle d'une molécule-gramme dans 5,000 litres, il y a précipitation de tétragayacoquinone.

L'acide citrique renfermerait, lui, deux atomes d'hydrogène actifs, comme les acides bibasiques : sulfurique, oxalique et tartrique. Une demi-molécule-gramme dans 2,000 litres paralyse complètement la laccase; dans 5,000 litres, elle laisse précipiter, en 24 heures, de la tétragayacoquinone.

L'acide borique, à ces grandes dilutions, n'a pas d'action appréciable; le gayacol est oxydé à peu près aussi vite qu'en milieu neutre. Si on augmente la quantité d'acide borique, l'atténuation devient sensible, mais très lentement. J'ai essayé l'acide borique jusqu'au plus grand degré de concentration possible, jusqu'à saturation (exactement 1 molécule-gramme dans 2 litres, ou 3. 1 0/0) : il y a eu encore oxydation diastatique. La coloration du liquide était même perceptible déjà après une heure, par comparaison avec un mélange témoin non additionné de laccase. Après 24 heures, le liquide était rouge grenadine, le témoin tout à fait incolore.

Cette inactivité pour ainsi dire complète de l'acide borique laisse bien supposer que les anomalies présentées par les acides phosphorique, arsénique et citrique sont dues à l'existence d'atomes d'hydrogène actifs à côté d'atomes d'hydrogène inactifs. Tandis que dans les acides bibasiques :

Sulfurique	SO^2H^2
Oxalique	$\text{CO}^2\text{H} - \text{CO}^2\text{H}$
Tartrique	$\text{CO}^2\text{H} - \text{CHOH} - \text{CHOH} - \text{CO}^2\text{H}$

les deux atomes d'hydrogène acides sont équivalents vis-à-vis de la laccase, de telle sorte qu'une demi-molécule de ces acides réagit aussi activement qu'une molécule d'un acide monobasique, il n'en est plus de même dans les acides.

Phosphorique	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{PO} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{OH} \\ \text{OH} \end{array}$
Arsénique	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{AsO} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{OH} \\ \text{OH} \end{array}$
Citrique	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CO}^2\text{H} - \text{CH}^2 - \text{C} - \text{CH}^2 - \text{CO}^2\text{H} \\ \\ \text{CO}^2\text{H} \end{array}$

Les deux premiers de ces acides tribasiques posséderaient un seul atome d'hydrogène actif et deux inactifs, le dernier, au contraire, deux actifs et un inactif.

J'ai cherché une confirmation de cette manière de voir dans l'action comparée des sels acides de potassium dérivés des acides polybasiques :

le sulfate monopotassique.	—	SO^4HK
l'oxalate	—	$\text{CO}^2\text{K} - \text{CO}^2\text{H}$
le tartrate	—	$\text{CO}^2\text{K} - \text{CHOH} - \text{CHOH} - \text{CO}^2\text{H}$
le phosphate	—	$\text{PO} \begin{cases} \text{OK} \\ \text{OH} \\ \text{OH} \end{cases}$
l'arséniate	—	$\text{AsO} \begin{cases} \text{OK} \\ \text{OH} \\ \text{OH} \end{cases}$
le citrate	—	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CO}^2\text{K} - \text{CH}^2 - \text{C} - \text{CH}^2 - \text{CO}^2\text{H} \\ \\ \text{CO}^2\text{H} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
et le citrate bipotassique		$\begin{array}{c} \text{CO}^2\text{K} - \text{CH}^2 - \text{C} - \text{CH}^2 - \text{CO}^2\text{K} \\ \\ \text{CO}^2\text{H} \end{array}$

Conformément à ce qu'on pouvait prévoir, le sulfate, l'oxalate, le tartrate et le citrate monopotassiques ont réagi, ou à peu près, comme des acides monobasiques ; ils en ont présenté l'extrême activité — toutes choses égales d'ailleurs — à la dose d'une molécule-gramme.

Le phosphate et l'arséniate monopotassiques, le citrate bipotassique, au contraire, se sont rangés, n'ayant plus de libres que les fonctions inactives sur la laccase, à côté de l'acide borique.

Voici, avec plus de détails, les observations :

Le sulfate et l'oxalate monopotassiques se sont comportés exactement comme des acides monobasiques actifs : à la dose d'une molécule-gramme dans 2,000 litres, ils ont arrêté entièrement l'action de la laccase au 1/4000. A la dilution N/5000 l'oxalate s'est montré un peu plus actif que le sulfate, parallèlement à ce qui avait été observé avec les acides libres.

Pour l'acide tartrique et l'acide citrique, il y a eu, par saturation de l'un des carboxyles, une diminution de l'activité supérieure à la moitié, car, à la dilution d'une molécule-gramme de crème de tartre ou d'une demi-molécule-gramme de citrate monopotassique dans 1,000 litres, il y a eu encore une faible oxydation du gayacol. Cette diminution d'activité, supérieure à la moitié, s'explique d'ailleurs aisément. Dans l'acide tartrique, il y a deux oxyhydriles qui tendent à contre-balancer, dans une certaine mesure, l'activité des groupements acides. Si on sature l'un de ceux-ci, l'influence des deux oxydriles se porte tout entière sur le seul carboxyle qui reste; on fait disparaître l'égalité qui existait dans l'acide entre les deux groupements fonctionnels. Quelque chose d'analogue se passe avec l'acide citrique.

Le phosphate et l'arséniate monopotassiques, ainsi que le citrate bipotassique, ont été essayés jusqu'à la concentration d'une molécule-gramme dans un litre (solution normale ou N/1). On a observé une précipitation de tétragayacoquinone, ou au moins une coloration rouge pourpre, après 24 heures, jusqu'à N/10 ou N/5. Avec N/2, la coloration des mélanges était encore nettement visible; enfin, avec N/1, on n'aperçoit qu'une teinte orangée, appréciable par comparaison avec des mélanges témoins, sans laccase, dont la couleur était alors jaune pâle.

Il faut observer ici que l'acidité n'entre pas seule en ligne de compte dans le ralentissement provoqué par les corps examinés en dernier lieu. A la concentration N/1, il y a par litre : 138 grammes de phosphate, 180 grammes d'arséniate et 268 grammes de citrate de potassium, supposés anhydres. La solubilité de l'oxygène et, par suite la vitesse d'oxydation du gayacol, doivent donc être notablement amoindries. En outre, il est probable que le phénomène d'hydrolyse qui intervient dans le processus oxydasique est lui-même partiellement entravé. Sans ces influences secondaires, le ralentissement de l'action oxydante serait encore moins sensible.

Ainsi, au point de vue de leur action sur la laccase, il existe dans les divers acides deux types d'hydrogène fonctionnel : l'un, doué d'une activité considérable, pouvant, à des doses infimes, arrêter toute oxydation; l'autre, au contraire, inactif

ou pour ainsi dire inactif. D'où provient cette différence? C'est une question à laquelle il n'est pas encore facile de donner une réponse définitive. Cependant, si on consulte les tables des chaleurs de neutralisation des acides, on remarque que tous les hydrogènes actifs sur la laccase dégagent, quand on les remplace par le sodium, au moins 12 calories 6 dixièmes. Au contraire, les hydrogènes inactifs dégagent seulement, dans les mêmes conditions, une quantité de chaleur égale ou inférieure à 11 calories 6 dixièmes.

Ainsi, en saturant une molécule des acides suivants par une molécule de soude, on obtient, d'après les recherches de Thomsen, de Berthelot, de Berthelot et Louguinine :

	Calories
Avec l'acide chlorhydrique.....	13,7
— formique.....	13,4
— acétique.....	13,3
— butyrique.....	13,7
— lactique.....	13,5
— benzoïque.....	13,5
— sulfurique.....	15,85
— oxalique.....	14,3
— tartrique.....	12,95
— phosphorique.....	14,7
— citrique.....	12,6

Si on ajoute une seconde molécule de soude, on obtient :

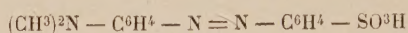
Avec l'acide sulfurique encore.....	15,85
— oxalique —	14,3
— tartrique —	12,95
— citrique —	12,8

Au contraire, avec l'acide phosphorique, on n'obtient plus que 11 cal. 6. L'acide borique donne, quand on le sature avec une seule molécule de soude, 11 cal. 6, comme le second hydrogène fonctionnel de l'acide phosphorique.

L'acide carbonique, bibasique, donne par saturation complète à la soude 20 cal. 2, soit, pour une demi-molécule, 10 cal. 1. J'ai pensé qu'il devait, lui aussi, être inactif sur la laccase. Je l'ai essayé dans un appareil à sparklets, à une concentration voisine de N/4 ; le liquide a commencé à se colorer en rose après une heure un quart et, le lendemain, il renfermait un dépôt de tétragayacoquinone.

Il existe une méthode purement chimique pour distinguer les acides qui paralysent énergiquement la laccase de ceux qui

sont dépourvus de cette propriété. Elle consiste dans l'emploi de certains réactifs colorés, notamment de l'hélianthine, appelée aussi tropéoline, orangé III ou encore méthyl-orange. Cette couleur, préparée par la maison Poirrier, est le sel de sodium du diméthylaminoazobenzène sulfoné.



Tous les composés actifs sont acides à la fois à la phtaléine du phénol, au tournesol et à l'hélianthine. Les composés inactifs réagissent comme acides seulement avec la phthaléine et le tournesol; ils sont neutres à l'hélianthine.

Le parallélisme entre l'action des composés acides sur le colorant azoïque et sur la laccase est si complet, qu'il est possible de prévoir les plus petites particularités signalées au cours de ce mémoire d'après la manière dont est produit le virage de l'hélianthine. Les composés comme l'acide chlorhydrique, l'acide oxalique, qui, lorsqu'on les emploie à saturer un alcali, en présence de l'indicateur, déterminent un virage presque instantané, du jaune au rouge, dès qu'on vient à dépasser la quantité nécessaire à la saturation, sont ceux qui agissent sur la diastase oxydante avec le maximum d'énergie.

Les composés qui ne déterminent plus qu'un virage progressif paralysent encore la laccase à de grandes dilutions, mais, leur activité, déjà plus petite que celle des acides précédents, décroît au fur et à mesure de leur aptitude à faire virer l'indicateur. C'est ce qu'on observe très nettement, par exemple, avec la série des acides formique, acétique et butyrique. Le premier de ces acides, à virage rapide, se range à côté des acides les plus forts; l'acide acétique, et surtout l'acide butyrique, dont le virage est de plus en plus lent, doivent être employés, pour produire le même effet, à des doses de plus en plus fortes.

Les composés, enfin, comme l'acide borique, l'acide carbonique, le phosphate monopotassique, le citrate bipotassique, qui ne réagissent pas sur l'hélianthine sont sans action appréciable sur la laccase.

La méthode chimique pour la distinction des deux sortes d'acides est excessivement simple à employer. Elle est en même temps plus précise et plus générale que la méthode thermochimique.

L'acide citrique a donné à Thomsen, puis à Berthelot et Louguinine, des chaleurs de saturation à peu près égales pour les trois fonctions acides. Voici les chiffres empruntés à leurs tableaux ¹.

Chaleur de saturation donnée par une première molécule de soude.				Calories
—	—	seconde	—	12,60
—	—	troisième	—	12,77
				12,93

D'après la remarque que j'ai faite plus haut, le citrate bipotassique devrait paralyser la laccase. Il n'en est rien; la règle thermochimique est donc en défaut. Il n'en est pas de même si on examine l'action de l'acide citrique et des citrates sur l'hélianthine.

Quand on sature progressivement une solution alcaline par de l'acide citrique, en présence de cet indicateur, on voit le liquide rester jaune jusqu'au moment où il apparaît du citrate monosodique; à partir de ce moment, il prend une teinte orangée, puis rouge; dès qu'il y a de l'acide libre, il devient d'un beau rouge. Inversement, quand on sature l'acide par la soude, le liquide reste rouge tant qu'on n'a pas dépassé une molécule de soude pour une d'acide; si on continue à verser de l'alcali, la teinte passe au rouge orangé, puis, peu à peu, au jaune pur; cette dernière couleur est atteinte seulement quand on dépasse deux molécules de soude pour une d'acide. Conformément à cette manière de se comporter vis-à-vis de l'hélianthine, l'acide citrique libre réagit sur la laccase comme un acide bibasique puissant; le citrate monopotassique (ou monosodique) comme un acide monobasique à virage progressif; enfin, le citrate bipotassique est sans action.

La façon dont se comportent les divers atomes d'hydrogène électro-négatifs, soit de l'acide phosphorique, soit de l'acide citrique, lorsqu'on les met en présence de la laccase, révèle des différences qu'il était assez difficile de prévoir par le simple examen des formules, surtout en ce qui concerne l'acide phosphorique. Il paraît nécessaire de tenir compte, entre les trois fonctions acides de ces composés, d'une différence beaucoup plus grande qu'on le fait d'habitude.

Il peut arriver, dans certaines recherches sur la laccase, qu'on soit excessivement gêné par la présence des acides, en

1. *Annales Chim. Phys.*, 5^e série t. IX, p. 11 (1876).

particulier quand il s'agit d'évaluer comparativement le pouvoir oxydasique de plusieurs sucres végétaux. Des différences très petites, même inappréciables aux réactifs les plus sensibles, dans le degré d'acidité de ces sucres, suffisent pour fausser complètement les résultats, pour en renverser quelquefois le sens. Beaucoup de sucres végétaux renferment assez d'acides (tartrique, citrique, oxalique, etc.), libres ou partiellement combinés, pour empêcher totalement l'action de la laccase. Il est un moyen de parer à cette circonstance défavorable, c'est de remplacer l'acidité des sucres par celle d'un acide inactif. Si on ajoute, par exemple, un peu de phosphate bipotassique, même en solution fortement acidifiée au tournesol par du sel monopotassique, à un liquide dans lequel la laccase est paralysée par un acide fort, on voit réapparaître le processus d'oxydation. Chose paradoxale au premier abord : la solution ajoutée, fortement acide au tournesol, rétablit l'activité d'un ferment soluble que paralysait une dose d'un autre acide, à peine suffisante pour impressionner le réactif colorant.

En pratique, on peut opérer de plusieurs façons pour faire disparaître l'acidité nuisible d'un liquide oxydasique. La plus simple consiste à neutraliser en présence de tournesol ou de phthaléine, à dépasser même très légèrement la dose d'alcali nécessaire, puis à revenir à une minime acidité avec de l'acide borique, du phosphate monopotassique ou du citrate bipotassique.

Dans ces expériences, j'ai utilisé une préparation de laccase très active et très pauvre en matières minérales; elle n'apportait donc dans les solutions que des traces de sels étrangers. C'est pourquoi les résultats ont été si nets.

Il en serait autrement si on opérait avec des sucres cellulaires ou des préparations riches en sels et, de plus, relativement pauvres en laccase. On pourrait très bien trouver alors que l'addition d'une petite quantité d'acide acétique ou sulfurique est presque sans effet, simplement parce que l'acide aurait été neutralisé, au sens de l'action antidiastatique, par la présence d'un sel d'acide inactif, comme un phosphate ou un citrate. C'est seulement à partir d'une certaine proportion d'acide ajouté, en rapport avec la quantité de sel neutralisant, qu'on percevrait un arrêt de la laccase. A moins d'employer compara-

tivement divers indicateurs colorés, parmi lesquels l'hélianthine. on ne pourrait analyser les phases du phénomène et on conclurait à l'existence d'une proportion critique d'acide au-dessus de laquelle le ferment soluble deviendrait très vite paralysé.

Ceci montre, d'une manière très générale d'ailleurs, avec quel soin il faut étudier à la fois au point de vue qualitatif et au point de vue quantitatif, la réaction des milieux où s'accomplissent des transformations diastasiques.

Les faits qui sont exposés dans ce mémoire apportent une notion nouvelle à la connaissance, encore très imparfaite, de la constitution chimique de la laccase.

Nous savions que ce ferment soluble est assimilable à un sel manganeux, mais nous ignorions tout de la nature du radical électro-négatif lié au métal. L'étude de l'action des acides sur la laccase, nous permet d'évaluer aujourd'hui le degré d'activité chimique de ce radical, de le ranger, approximativement, à côté du diméthylaminoazobenzène sulfoné. Est-ce un acide de la série des polysaccharides? est-ce un acide aminé, une substance protéique? C'est un point au sujet duquel nous sommes pour le moment réduits aux suppositions. On peut, d'ailleurs, d'après mes précédentes recherches, entrevoir non pas une oxydase, mais une série d'oxydases manganeuses, différentes les unes des autres par la nature du radical électro-négatif.

J'ajouterai, pour terminer, que les faits observés en étudiant l'influence des acides sur la laccase, paraissent susceptibles d'une certaine généralisation. Non seulement ils s'appliquent, dans leurs grandes lignes, à la tyrosinase, mais sans doute aussi à des ferments solubles d'un type bien différent, à des diastases hydrolysantes. Ainsi, d'après les observations de Fernbach¹, corroborées par celles de Maquenne et Roux², la saccharification de l'amidon par l'extrait de malt atteint son maximum d'intensité dans un milieu contenant des phosphates primaires, mais exempt d'acide phosphorique libre, c'est-à-dire neutralisé exactement à l'hélianthine. Peut-être y a-t-il, le manganèse mis à part, quelque rapport insoupçonné entre la diastase du malt et l'oxydase de l'arbre à laque?

1. *C. R. Ac. des Sciences*, t. CXLII, p. 285 (1906). Voir aussi FERNBACH et WOLFF, *id.*, t. CXLV, p. 261 (1907).

2. *C. R. Ac. des Sciences*, t. CXLII, p. 424 (1906).

ROLE DES BACTÉRIES

dans le développement de certains Myxomycètes

PAR ERNEST PINOY

(Suite et fin.)

III

RECHERCHES SUR LES MYXOMYCÈTES ENDOSPORÉS

Dans la nature, les Myxomycètes endosporés se rencontrent le plus souvent sur les feuilles mortes, la mousse, les branches de bois mort et sur les vieux troncs d'arbres pourris.

Rien n'est plus facile que d'en avoir des cultures au laboratoire, en y transportant les fragments de bois ou les feuilles mortes qui les portent. Ces matériaux sont mis dans des assiettes que l'on recouvre d'une cloche. Il suffit de les arroser dès le début. On soulève ensuite de temps en temps la cloche de manière à maintenir un état d'humidité et d'aération convenable. J'ai pu obtenir ainsi sur les mêmes fragments de bois, pendant plusieurs années consécutives, des cultures d'*Arcyria ferruginea*, de *Trichia varia*, de *Comatricha obtusata* et de *Stemonitis fusca*.

Ce sont des procédés de cultures analogues qu'ont employé la plupart des savants, Cienkowski, Rostafinsky, de Bary, Lister, qui ont étudié le développement de ces Myxomycètes.

Je rappellerai brièvement les essais de culture en milieu plus ou moins artificiel que quelques auteurs ont réalisés.

Cienkowski (6) a obtenu les plasmodes de *Licea pannorum* (*Perichæna populina* Fries) en ensemençant les spores sur des carottes pourries. Il a cultivé *Didymium libertianum* (*Didymium difforme* Duby) dans l'eau.

Ward (35) étudie en gouttes pendantes, dans une décoction de jacinthes, un Myxomycète qu'il ne détermine pas (il s'agit probablement du *Didymium difforme*) et qu'il avait trouvé sur des racines de jacinthes cultivées dans de l'eau contenant un peu de sel de chaux, de magnésie, de potasse et de soude. La chambre humide était aseptisée au préalable et il obtenait ainsi une culture ne renfermant exclusivement que des Bactéries.

Stahl et, après lui, Strasburger (31) emploient pour le *Chondrioderma difforme* (*Didymium difforme*) un milieu analogue à celui de Ward. Ilsensemencent les spores dans une décoction de tiges de Fève; puis ils font plonger dans cette décoction des tiges du même végétal, et sur celles-ci ils voient se former les plasmodes et les appareils sporifères. Ensch (9) a répété les expériences de ces auteurs et fait remarquer qu'il est curieux de voir que les plasmodes se forment uniquement sur les tiges de Fève et non sur les parois du récipient. Cela tiendrait à ce que la tige de Fève laisse diffuser dans le liquide de culture une substance chimique exerçant sur les amibes une influence chimiotaxique. Toutes les amibes sont attirées vers la tige de Fève et l'on comprend que les plasmodes ne puissent se former que là.

Dans un travail fait au laboratoire de Pfeffer, Stange (30 bis) avait déjà montré que les myxamibes de *Chondrioderma* étaient attirées dans des tubes capillaires contenant de l'extrait de Fève. Toutes les cultures de ces auteurs sont très impures. Les Bactéries, les Flagellates, les Amibes y pullulent.

Comme Ward, Miller (49) obtient des cultures où les seules impuretés sont des Bactéries. Il cultive ainsi *Physarum cinereum*, un *Stemonitis*, *Chondrioderma* (*Didymium*) *difforme*, *Didymium microcarpon* (*Didymium nigripes* Fries). Son milieu de culture consiste en une solution de foin ou d'eau additionnée de 2 0/0 de lait. Il y fait plonger des brindilles de foin et le tout est stérilisé.

Dans un travail récent, Constantineanu (8) dit avoir pu réussir des cultures de Myxomycètes dans les solutions suivantes : Knop 1 0/0, dextrine 1 0/0, glucose 2, 5 0/0, ou bien Knop 1 0/0, dextrine 5 0/0. Il a soit seulement les plasmodes, soit quelquefois aussi les appareils de fructification d'*Ethalium septicum*, *Physarum didermoides*, *Didymium effusum*, *Badhamia macrocarpa*, *Leocarpus vernicosus*, *Amaurochaete atra*, *Chondrioderma reticulatum*.

Dans son étude, Constantineanu ne s'est occupé ni de la pureté de ses cultures, ni du rôle que les Bactéries pouvaient y jouer en modifiant la composition du milieu.

Peut-on obtenir une culture pure de Myxomycètes endosporés?

Il faut pour cela avoir des spores pures¹. Jusqu'ici je n'ai pu y réussir. Je n'ai pu y réussir pour deux raisons :

1. J'entends par spores pures, des spores qui, mises dans un tube de bouillon, laisseront ce bouillon indéfiniment stérile.

1° Parce que l'intérieur des sporanges de Myxomycètes est rempli d'impuretés (Bactéries, spores de Champignons, kystes de Protozoaires);

2° Parce que les spores des Myxomycètes endosporés ne résistent pas à un chauffage un peu élevé en milieu humide. Comme elles sont accompagnées de Bactéries sporulées, l'éther et le chloroforme ne peuvent donner aucun résultat.

Pour donner une idée de la quantité d'impuretés contenue dans un sporange de Myxomycète, je vais exposer le résultat d'une numération des germes uniquement bactériens contenus d'une part dans un sporange jeune, d'autre part dans un sporange mûr de *Trichia varia*, développé sur bois dans une assiette sous cloche.

Le sporange jeune est prélevé à l'aide de pinces flambées. Puis, la calotte supérieure est enlevée à l'aide de l'extrémité d'une pipette chauffée au rouge. Avec une autre pipette, il est facile de vider le sporange de son contenu. Le contenu étant dilué dans l'eau ordinaire stérile, on fait une numération approximative des germes par ensemencement dans la gélatine répartie dans des boîtes de Pétri. Sans tenir compte des germes inaptes à se rajeunir, nous trouvons 200 colonies pour un sporange qui n'a certainement pas 2 millimètres cubes de capacité.

Les germes les plus fréquents sont les *Bacillus fluorescens* var. *liquefaciens* et var. *putridus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus luteus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus violaceus*, *Sarcina aurantiaca*.

Pour le sporange mûr, le nombre obtenu a été plus fort, 375 colonies, mais il faut tenir compte de la manière d'opérer qui est différente et qui introduit une cause d'erreur. En effet, on est forcé de faire éclater le sporange avec une pointe flambée au-dessus d'une boîte Pétri stérile, puis de reprendre par l'eau le contenu de la boîte Pétri; or, forcément, il y a un peu de débris de membrane qui amènent des germes étrangers.

Ne pouvant avoir des spores pures, ne pouvant par conséquent avoir recours immédiatement à la méthode synthétique, j'ai procédé par analyse.

Un sporange de *Didymium difforme* est prélevé aseptiquement et mis dans une boîte de Pétri stérile. On le fait éclater avec une pointe flambée. Les spores ainsi disséminées sont recueillies peu à peu à l'aide d'une spatule stérile trempée

dans de l'eau stérilisée et réparties à la surface d'une gélose nutritive, dans un grand nombre de tubes.

Cette gélose est préparée de la manière suivante :

20 grammes de gélose sont mis à laver dans un courant d'eau pendant 24 heures. Puis on les rince à plusieurs reprises dans l'eau distillée. Enfin on les met dans un litre d'eau, dans lequel on ajoute 20 grammes de bois pourri. Le tout chauffé à 115° est réparti après filtration dans les vases de culture et l'on stérilise par chauffage à 114° pendant 1/4 d'heure.

Les tubesensemencés sont laissés à la température du laboratoire. Un petit nombre de tubes, examinés après quelques jours, ne montrent aucune culture ni de Bactéries, ni du Myxomycète. Le plus grand nombre montre dès le début des cultures très variées de Bactéries, d'Amibes, de Flagellates. Enfin d'autres, d'aspect beaucoup plus pur, montrent des zoospores dans l'eau de condensation. Sur ceux-ci, on ne tarde pas à voir paraître des plasmodes, puis des appareils sporifères.

Le développement de *Didymium difforme* peut être très rapide et s'effectuer en moins de 4 jours.

C'est parmi ces tubes que j'ai pu trouver *Didymium difforme* en culture pure mixte avec une Bactérie. Cette Bactérie isolée et ajoutée aux tubes qui, contenant des spores de *Didymium difforme*, étaient restés stériles a permis le développement complet de *Didymium difforme*.

Cette Bactérie a la forme d'un bâtonnet d'une longueur de 2 à 3 μ et d'une largeur de 1 μ environ. Elle est immobile et prend le Gram. On y observe la formation des spores tantôt au milieu, tantôt près de l'une des extrémités.

Les colonies sur plaques de gélatine sont nummulaires, d'un beau jaune; elles ne liquéfient pas la gélatine. Le bouillon se trouble et il y a formation d'un voile à la surface.

Sur gélose la strie d'ensemencement est plus ou moins épaisse, jaune, luisante avec des rugosités.

D'après ces caractères, cette bactérie se rapproche de *Bacillus luteus* Flügge.

En ajoutant cette même Bactérie à des tubes de gélose de bois contenant des spores de *Didymium effusum* qui ne s'étaient pas développées, j'ai réussi à produire l'évolution complète de ce Myxomycète.

Des essais, faits avec quelques autres Bactéries (*B. fluorescens*, *B. coli*), ne m'ont donné aucun résultat. D'où j'ai conclu que si cette Bactérie n'est pas absolument nécessaire (certaines Bactéries peuvent peut-être jouer le même rôle), du moins elle est très favorable.

En résumé, tandis que jusqu'ici on n'avait eu que des cultures très impures, je suis arrivé à cultiver deux espèces de Myxomycètes endosporés avec une seule Bactérie, montrant ainsi que l'on peut comme pour les Amibes, comme pour les Myxomycètes acrasiciées, avoir des cultures pures mixtes de Myxomycètes endosporés.

OBSERVATIONS SUR LES CULTURES DE *Didymium difforme* ET DE
Didymium diffusum.

Lorsque les colonies bactériennes sont séparées à la surface du milieu, on remarque que les plasmodes se forment toujours au niveau des colonies bactériennes. Peut-être faudrait-il chercher là l'explication du fait que dans les expériences de Stahl, d'Ensch, les plasmodes se forment seulement sur les tiges de Fève. En effet, alors que le milieu liquide est épuisé, n'est plus convenable pour la culture des Bactéries qui s'y trouvent, la tige de Fève offre aux Bactéries un bon milieu de culture et par suite attire les myxamibes.

Lorsque les plasmodes vont fructifier, ils fuient les colonies bactériennes et l'humidité.

Pourtant si l'on fait la culture en milieu liquide, en vase d'Erlenmeyer selon la méthode de Miller, on voit qu'avant de fructifier, le plasmode qui est sorti du liquide se nourrit encore par osmose durant quelque temps.

Il laisse quelques fins prolongements plonger dans le liquide. Puis, à un moment, ces prolongements se rétractent eux-mêmes, le plasmode se rassemble en plusieurs petites masses qui se transforment en sporanges.

Il arrive assez fréquemment soit que le substratum soit trop sec, soit que la gélose soit couverte de Bactéries, de voir *Didymium effusum* former son appareil sporifère dans l'eau de condensation. Dans ces conditions le pied avorte, le capillitium est très réduit; les spores sont mêlées d'éléments arrondis beau-

coup plus gros dont la membrane sans ornements est plus épaisse et ne présente pas la réaction de la cellulose; ce sont de véritables kystes.

Il n'est pas rare d'observer l'existence de kystes semblables dans les sporanges de nombreux Myxomycètes.

Je les ai constatés dans des sporanges de *Leocarpus vernicosus*, d'*Arcyria ferruginea*, de *Trichia varia*.

Il faut sans doute attribuer à la présence ou à l'absence de ces kystes les opinions contradictoires des auteurs relatives à la durée de la vitalité des spores.

On ne doit pas oublier que chez les Myxomycètes les kystes sont les véritables formes de résistance tandis que les spores ne sont que des organes de dissémination.

J'ai eu des plasmodes de *Didymium effusum* par l'ensemencement de kystes datant de cinq ans.

Les kystes supportent très bien l'action des solutions alcalines concentrées. J'avais vu là un moyen de purification des Myxomycètes. Seulement les plasmodes obtenus, quoique associés avec *Bacillus luteus*, n'ont jamais donné d'appareils de fructification.

La même chose s'est produite dans mes cultures pures mixtes successives de *Didymium difforme* et de *Didymium effusum*. Après plusieurs ensemencements fructueux, le milieu et les conditions extérieures étant les mêmes, il n'y a plus eu dans les cultures que production de plasmodes qui se transformaient en sclérotés (amas de kystes).

Il y a lieu par suite de se demander si, pour la fructification, il n'est pas nécessaire qu'il y ait une conjugaison préalable de plasmodes de signes différents (+ et —), de même qu'il faut deux thalles différents, chez certaines Mucorinées, d'après les recherches de Blakeslee pour la production de l'œuf. Dans cette hypothèse, il n'y aurait plus eu dans mes cultures que des plasmodes de même signe.

Ensch a fait sur *Didymium difforme* l'observation suivante : les spores qui germent sur milieu solide donnent directement une myxamibe.

J'ai pu vérifier ce fait et voir qu'il en est de même pour *Didymium effusum*. La zoospore ne se produit qu'en milieu liquide.

Dans les mêmes conditions, sur milieu solide, j'ai observé la germination des spores de *Spumaria alba*. La masse protoplasmique et le noyau des spores se divisent en deux, en quatre, puis en huit, et on a huit myxamibes.

IV

RECHERCHES SUR LE *PLASMODIOPHORA BRASSICÆ*

Depuis le travail classique où Woronin montrait que la « hernie » du Chou est due à l'introduction d'un parasite, le *Plasmodiophora brassicæ*, dans les cellules de la racine du végétal, ce Myxomycète a été l'objet de nombreux travaux cytologiques dont les plus complets sont ceux de Nawaschin et de Prowazek; même quelques auteurs, comme Podwyssotzki ont voulu voir une certaine relation entre lui et le cancer de l'homme.

Sa biologie au contraire a été peu étudiée et cependant c'est son étude biologique qui seule pourra permettre de trouver le moyen de le combattre avec efficacité. Car ce parasite occasionne des pertes considérables et une fois qu'il a envahi une culture de Choux, il n'y a pas d'autres remèdes que d'abandonner cette culture.

Les recherches que j'ai précédemment exposées sur les Myxomycètes endosporés et acrasiés, m'ont amené à rechercher si les Bactéries ne jouaient pas un rôle dans le développement de ce parasite.

En souillant avec des spores de *Plasmodiophora brassicæ* la terre contenue dans des pots où j'avais ensemencé des graines de *Brassica oleracea*, j'ai reproduit l'infection expérimentale.

Les petites tumeurs produites sur les racines des jeunes plants furent fixées dans le liquide de Flemming-Borrel, dont la composition a été indiquée plus haut, et incluses dans la paraffine. Les coupes ont été colorées de la manière suivante d'après une méthode de Borrel :

Mordantage au tannin à 1 0/0 pendant 1/2 heure; surcoloration à la thionine, puis différenciation par la même solution de tannin.

Cette méthode (Planche XV, fig. 8) colore très bien le parasite et ses noyaux sont bien visibles, formés d'un karyosome (K) central entouré d'une zone claire limitée par une membrane et

plongés au milieu d'un protoplasme granuleux contenant de nombreuses gouttelettes d'huile colorées en noir par l'acide osmique. En outre dans les cellules envahies par le parasite et dont le noyau (N) présente toujours une hypertrophie du nucléole (*n*), on distingue au milieu des granulations protoplasmiques et de leucites, de petits amas (B) morphologiquement semblables à des amas de Bactéries. Ils sont très fortement colorés et sont constitués par des formes soit *coccus* soit *bacille*, isolées ou bien associées par deux.

L'observation microscopique ne pouvait donner qu'une indication et on ne pouvait conclure avec certitude que les zoospores du parasite en pénétrant dans les racines de la plante y avaient introduit des Bactéries. Il était nécessaire de le démontrer par la méthode des cultures.

Mes premières recherches furent faites avec les petites tumeurs que j'avais à ma disposition. Je fis des prélèvements aseptiques dans un grand nombre d'entre elles en brûlant la surface avec un fer rougi et puisant dans l'intérieur avec une pipette stérile. L'ensemencement du contenu de la pipette dans du bouillon donna toujours lieu à une culture bactérienne.

Mais étant donné le peu de volume des tumeurs, je ne pouvais brûler très profondément; il pouvait y avoir là une cause d'erreur.

J'ai eu alors un matériel de choix dans des tumeurs, grosses comme le poing, formées sur *Brassica sinensis*¹. Ces tumeurs ne présentent aucune trace de pourriture; sur la coupe, elles sont d'une blancheur magnifique.

La surface d'une de ces tumeurs est, comme précédemment, brûlée profondément en un point avec un fer rouge et des prélèvements aseptiques sont opérés au moyen de pipettes flambées.

Les prises ainsi faites contiennent un grand nombre de spores du parasite. Ensemencées en bouillon, sur gélatine, sur gélose, elles donnent lieu à un abondant développement de Bactéries. Dans les cultures bactériennes ainsi obtenues, on rencontre presque toujours des Bactéries fluorescentes.

Ainsi en s'introduisant dans la racine du Chou, le parasite y introduit des Bactéries. Quel rôle jouent-elles?

1. Ces tumeurs m'avaient été obligeamment fournies par M. le professeur Mangin.

Pour étudier ce point particulier, il était nécessaire de faire des cultures du parasite, de pouvoir suivre en tube le développement de *Plasmodiophora brassicae*.

J'ai pu réussir à obtenir le développement expérimental du *Plasmodiophora brassicae*, en employant la même technique dont Matruchot et Molliard (16) s'étaient servis pour la culture du *Phytophthora infestans*. Ces auteurs ont en effet cultivé le Champignon de la maladie de la Pomme de terre en l'ensemencant sur des fragments prélevés aseptiquement dans l'intérieur d'une pomme de terre à l'aide d'un emporte-pièce stérile. De même, je me suis servi de l'emporte-pièce que Borrel a fait construire pour prélever aseptiquement des morceaux de tissu cancéreux; l'instrument était stérilisé au four à flamber, la surface de jeunes navets était profondément brûlée au brûle-peau. On pouvait ainsi prélever aseptiquement des fragments que l'on mettait dans des tubes flambés. Ces tubes étaient ensemencés avec des spores prélevées elles-mêmes aseptiquement, comme plus haut, à l'intérieur des tumeurs. Ils étaient fermés à la lampe et placés à l'étuve à 22°.

Il se produit dès les premiers jours une culture discrète de Bactéries aérobies, culture bientôt arrêtée par suite de l'épuisement de l'oxygène. Cinq jours déjà après l'ensemencement, on trouve à l'intérieur des cellules du fragment de navet, le *Plasmodiophora* à divers stades, plusieurs cellules sont même bourrées de spores.

Répétons la même expérience en tubes ouverts, en tubes simplement bouchés au coton : les Bactéries aérobies qui accompagnent les spores pullulent et amènent la pourriture du navet.

J'ai avantageusement modifié la technique que je viens d'exposer par l'emploi de l'huile de vaseline. En effet, il arrive souvent que les spores sont souillées, non seulement de Bactéries aérobies, mais aussi de Bactéries anaérobies; dans ce cas, les gaz produits par la fermentation arrêtent l'évolution du Myxomycète et en même temps le tube est transformé en une bombe dangereuse. On évite de fermer le tube, en mettant de l'huile de vaseline stérilisée dans les tubes, de manière à recouvrir complètement les fragments de navets.

Ainsi, de même que, d'après les recherches de Matruchot et Molliard, la pourriture dans la maladie de la Pomme de terre est causée par les Bactéries introduites par le Champignon (dans les cultures pures du *Phytophthora infestans* sur la Pomme de terre, on ne constate en effet jamais de pourriture), de même la pourriture de la hernie du Chou est due aux Bactéries introduites dans la racine par le parasite. Ces Bactéries se mettent à pulluler quand les conditions extérieures sont favorables et on sait que ces conditions sont un terrain humide, la pluie. Tout le tissu des racines se détruit et il n'en reste absolument que la partie libreuse.

On peut voir ici une véritable symbiose entre le Myxomycète et les Bactéries.

Le Myxomycète entraîne les Bactéries avec lui, et les amène dans un milieu qui leur deviendra extrêmement favorable; de leur côté les Bactéries en détruisant la racine du Chou mettront en liberté les spores du parasite qui sont incluses dans les cellules.

En outre il semble que les Bactéries soient nécessaires à la vie extracellulaire du parasite.

En effet, des spores ayant étéensemencées sur un grand nombre de tubes de gélose à l'eau, la plupart de ces tubes contenant des Bactéries ont donné lieu à un début de développement : j'ai pu y observer la formation de zoospores, puis d'amibes extrêmement petites qui s'arrondissent et ont alors un diamètre de 3 à 4 μ . Ces amibes périssent le plus souvent, mais, parfois, elles s'entourent d'une membrane qui ne présente pas la réaction de la cellulose et qui se colore en jaune par l'iode. Avec ces petits kystes, j'ai reproduit l'infection expérimentale et les cultures.

Je n'ai pas constaté l'évolution des spores dans les tubes où il n'y avait pas de culture bactérienne.

CONCLUSIONS

1° Par l'étude de trois espèces d'Acrasiées, de deux Myxomycètes endosporés et enfin d'une espèce parasite, je crois avoir établi la grande importance que peut prendre l'association des Bactéries dans le groupe des Myxomycètes. Que certains

Myxomycètes puissent vivre avec d'autres microbes ou même se nourrir uniquement par osmose, c'est à démontrer;

2° Dans la nature, les spores de Myxomycètes ne sont jamais pures, qu'elles soient contenues dans du mucus comme chez les Acrasiées, dans un sporange comme chez les Endosporées, dans une cellule de la racine d'un végétal comme chez une espèce parasite, *Plasmodiophora brassicae*. Jusqu'ici on ne connaît pas de Myxomycète capable de vivre en culture pure. Mais il est possible d'avoir des cultures dites *cultures pures mixtes*, où le Myxomycète est en association avec une seule Bactérie;

3° J'ai réalisé la culture pure mixte de trois Acrasiées, *Dictyostelium mucoroides*, *Dictyostelium purpureum*, et *Polysphondylium violaceum* avec diverses Bactéries;

4° Ces Myxomycètes sont parasites des colonies bactériennes. Leurs myxamibes ingèrent les Bactéries et les digèrent dans leurs vacuoles à l'aide d'une diastase voisine de l'amibo-diastase;

5° J'ai montré l'importance taxinomique que peuvent prendre les pigments des Bactéries chromogènes associées. J'ai fait en même temps quelques recherches sur la coloration vitale des myxamibes par les pigments bactériens;

6° J'ai ajouté des observations sur la cytologie et le développement de l'appareil sporifère des Acrasiées étudiées;

7° J'ai réalisé la culture pure mixte avec *Bacillus luteus* Flügge de *Didymium effusum* et de *Didymium difforme*, deux Myxomycètes endosporés; j'ai donné des remarques sur ces cultures;

8° Enfin, en étudiant le développement d'un Myxomycète parasite des racines des Crucifères, le *Plasmodiophora brassicae*, à l'aide de cultures faites *in vivo* et *in vitro*, j'ai mis en évidence le rôle que jouent les Bactéries introduites dans les racines par le Myxomycète. Ce sont elles qui amènent la pourriture lorsque les conditions extérieures deviennent favorables à leur pullulation. Ici, j'ai pu montrer qu'il s'agissait d'une vraie symbiose.

BIBLIOGRAPHIE

1. — DE BARY A. *Die Mycetozoen (Schleimpilze)*, Leipzig, 1864.
2. — BEYERINCK. Culturversuche mit Amöben auf festem Substrate. *Centralbl. f. Bakt. I. Abth.* Bd XIX, 1896.
3. — BREFELD. *Dictyostelium mucoroides*, ein neuer Organismus aus Verwandtschaft der Myxomyceten. *Nat. gesellschaft.* Bd VII, 1869. — *Polysphondylium violaceum* und *Dictyostelium mucoroides* nebst Bemerkungen zur Systematik der Schleimpilze, *Unters. aus dem Gesamtgebiete der Mykologie.* Heft VI, 1884.
4. — CELAKOWSKI L. Ueber die aufnahme lebender und todtler verdaulicher Körper in die Plasmodium der Myxomyceten, *Flora.* Bd LXXVI, 1892.
5. — CHRZASZCZ. *Physarum leucophæum*, eine hefe fressende Amöbe. *Centralblf. Bakt.*, 1902, 2e partie, t. VIII.
6. — CIENKOWSKI. Zur Entwicklungsgeschichte der Myxomyceten, *Jahrbücher für wiss. Botanik.* Bd III, 1863.
7. — CLATCHIE MC. Notes on germinating myxomycetous spores, *Botan. gazette*, t. XXX, 1894.
8. — CONSTANTINEANU. Ueber die Entwicklungsbedingungen der Myxomyceten, *Ann. myc.*, vol. IV, n° 6.
9. — ENSCH. Notes sur les Myxomycètes. *Trav. Laborat. Wimereux.* t. VII, 1899.
10. — FROSC. Zur Frage der Reinzüchtung der Amöben. *Centralbl f. Bakteriologie*, I Abth. Bd XXI, 1897.
11. — GRIMM. Ueber den Bau und die Entwicklungsgechichte von *Dictyostelium mucoroides* (d'après Potts).
12. — JAHN. Myxomycetenstudien; 4 Die Keimung der Sporen. *Bot Ges.* t. XXIII, 1905.
13. — KRUKENBERG. Ueber die Enzyymbildung der Geweben und Gefässen. *Untersuch. d. phys. Instit. Heidelberg*, t. II, 1878.
14. — LISTER. Notes on the plasmodium of *Badhamia*, *Ann. of Botan.*, t. II, 1888; — Note on the Ingestion of food material by the swarmcells of Mycetoza. *Journ. Lin. Soc. London*, t. XXV, 1890. — Mycetoza. London, 1894.
15. — MATRUCHOT. Sur une structure particulière du protoplasma chez une Mucorinée et sur une propriété générale des pigments bactériens et fongiques, *Trav. Lab. Wimereux*, t. VII, 1899.
16. — MATRUCHOT et MOLLARD. Culture du *Phytophthora infestans*. Lons-le-Saunier, 1901.
17. — MESNIL. Recherches sur la digestion intracellulaire et les diastases des Actinies, *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. XV, 1901.
18. — METCHNIKOFF. Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation. Paris, 1892. — Sur l'acide des Plasmodes. *Ann. de l'Inst. Past.*, t. III, 1889.
19. — MILLER. The aseptic cultivation of Mycetoza. *Quarterly Journal of microscopical science*, Vol. XLI, 1899.

20. — MOUTON. Recherches sur la nutrition des Amibes et sur leur diastase intracellulaire, *Ann. de l'Institut. Pasteur*, t. XVI, 1902.

21. — NADSON. Des cultures de *Dictyostelium mucoroides* et des cultures des Amibes en général. *Script. botanica*, fasc. XV, Saint-Petersbourg, 1899.

22. — NAWASCHIN. Beobachtungen über der feineren Bau und umwandlungen von *Plasmodiophora brassicæ* Woron. im Laufe ihres intracellularen Lebens, *Flora*, 1899, Bd. LXXXVI, 5 Heft.

23. — OLIVE. Monograph of the Acrasieæ, *Proceedings of the Boston Society of Natural History*, vol. XXX, n° 6.

24. — PFEFFER. *Pflanzen physiologie*, I. Bd, Leipzig, 1897

25. — PINOY. Nécessité de la présence d'une Bactérie pour obtenir la culture de certains Myxomycètes, *Bull. Société mycol. de France*, t. XVIII, 3^e fascicule, 1902; — Nécessité d'une symbiose microbienne pour obtenir la culture des Myxomycètes, *C. R. Acad. des Sc.*, t. CXXXVII, 1903; — Rôle des Bactéries dans le développement du *Plasmodiophora brassicæ*, Myxomycète parasite produisant la hernie du Chou, *C. R. Soc. de Biologie*, t. LVIII, p. 1010, 1905.

26. — POTTS. Zur Physiologie des *Dictyostelium mucoroides*. *Flora*, Bd XCI, 1902.

27. — PRILLIEUX. *Maladies des plantes agricoles*, Paris, 1897, t. I, p. 40.

28. — PROWAZEK. Ueber den Erreger der Kohlhernie, *Plasmodiophora brassicæ*, und die Einschlüsse in den Carcinomzellen. *Arb. a. d. Kais. Gesundheitssammlte*, t. XXII, pp. 396-410, 1903.

29. — SCHROEDER. Ueber den Nachweis einiger Enzyme in den Fruchtkörper der lohlblüte, *Beitrag. zur chem. Physiol. und Pathol.* IX Band 1906.

30. — STAHL. Zur logeiBioder Myxomyceten. *Botan Zeitung*, 1884, nos 10-12.

30 bis. — STANGE. Ueber chemotaktische Reizbewegungen. *Botan. Zeit.*, p. 107, 1890.

31. — STRASBURGER. *Das Botanische Practicum*, 1902, p. 474.

32. — TSUJITANI. Ueber die Reincultur der Amöben, *Centralbl. f. Bakt.* Bd XXIV, 1898.

33. — VAN TIEGHEM. Sur quelques Myxomycètes à plasmode agrégé, *Bull. Soc. Bot. de France*, t. XXVII, p. 317-322.

34. — VUILLEMIN. Une Acrasiée bactériophage. *C. R. Acad. des Sc.*, t. CXXXVII, 1903.

35. — WARD. The morphology and physiology of an aquatic myxomycete *Studies from the biological laboratories of the Owens college*, vol. I, 1886

36. — WORONIN. Über die Krankheit der Kohlgewachse. *Jahrbücher f. Wissenschaft. Bot. herausgeg. von Pringsheim*, t. XI, 1878.

37. — ZAUBITZER. Studien über eine dem Strohinfus entnommene Amöbe. *Centralbl. f. Bakt. I, Abth.* Bd XXX, 1900.

EXPLICATION DES PLANCHES

(Voir ces *Annales*, n° 8, pl. XIII à XVI).

PLANCHE XIII

Fig. 1. — Photographie d'une culture de *Dictyostelium purpureum*. On voit que les appareils sporifères partent tous des colonies bactériennes et se dirigent vers le fond de la boîte, vers la lumière dont la direction est indiquée par la flèche.

Fig. 2. — *a*, myxamibe de *Dictyostelium mucoroides* : on voit son noyau. — Photographie d'une préparation colorée à l'hématoxyline au fer.

Fig. 3. — *a*, myxamibe de *D. mucoroides* dont le noyau s'est divisé.

b, myxamibe de *D. mucoroides* provenant d'une division; les deux chromosomes ne se sont pas encore séparés. Grossissement : 1200.

PLANCHE XIV

Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11. — Germination de la spore de *D. mucoroides*. Les grains chromatiques sont colorés en rouge. Coloration à la méthode Laveran.

Fig. 12. — Jeune myxamibe dont le noyau est en voie de division.

Fig. 13. — Jeune myxamibe se divisant.

Fig. 14. — Jeune myxamibe émettant des pseudopodes lobulés.

Fig. 15. — Jeune myxamibe à l'état de repos.

Fig. 16, 17. — Myxamibe dont le noyau s'est divisé.

Fig. 18. — Myxamibe dont les chromosomes se divisent.

Fig. 19. — Myxamibe après la division. Les deux chromosomes sont encore réunis.

20. — Myxamibes encore réunies.

Fig. 21, 22, 23. — Diverses formes de myxamibes.

Fig. 24, 25. — Formes de division.

Les figures 12 à 25 proviennent de préparations de *D. mucoroides* colorées à l'hématoxyline au fer.

Fig. 26, 27, 28, 29, 30. — Myxamibes d'une culture de 40 heures d'après des préparations colorées par la méthode Laveran. — On peut voir un grand nombre de Bactéries en voie de digestion à l'intérieur des vacuoles. N, noyau, B, Bactéries.

Tous les dessins sont faits au grossissement de 900.

PLANCHE XV

Fig. 1 et 2. — Myxamibes de *Dictyostelium purpureum* d'une culture de 40 heures. Coloration méthode Borrel : rouge de Magenta, picro indigo carmin. On voit de nombreuses Bactéries dans les vacuoles. N, noyau, B, Bactéries.

Fig. 3. — Myxamibe de *Dictyostelium purpureum*. Coloration par la thionine. Le noyau N n'est pas distinct. Les Bactéries se voient bien dans les vacuoles.

Fig. 4, 5, 6, 7. — Myxamibes de *Polysphondylium violaceum*, culture de 40 heures. Coloration par la méthode Laveran.

Fig. 8. — Coupe d'une tumeur de racine de chou due au *Plasmodiophora brassicae*. N, noyau des cellules du parenchyme, n, nucléole, g, grains d'amidon.

K noyaux du parasite. Les points noirs sont des granulations de graisse noircies par l'acide osmique. C, cellule envahie dont le noyau est en karyokinèse. B, Bactéries.

Tous les dessins sont faits au grossissement de 1000.

PLANCHE XVI

Fig. 1. — Coupe sagittale d'un amas de myxamibes. Début de formation de l'appareil sporifère. C, masse d'amibes devenant claires et vacuolaires : ébauche de la formation du pied. Grossissement : 75.

Fig. 2. — Coupe transversale d'une masse un peu plus âgée, le pied P s'est différencié. Grossissement : 150.

Fig. 3. — Coupe sagittale d'une masse de même âge montrant la torsion de la masse en même temps que celle du pied P. Grossissement : 50.

Fig. 4. — Coupe sagittale montrant le pied P formé au début de l'élévation de la masse sporifère. Grossissement : 50.

ACTION ANTISEPTIQUE DU MÉTHANAL SEC

aux différentes températures sur les germes microbiens
et en particulier sur les spores du "*Bacillus subtilis* "

PAR L. PERDRIX

Dans un précédent mémoire¹, j'ai montré la rapidité de l'action destructive exercée par le méthanal sec sur les spores du *bacillus subtilis*, à la température de 100°. Pour ces expériences, j'employais un appareil dont j'ai donné la description, qui permet de maintenir, à volonté, les objets dans une atmosphère saturée d'aldéhyde formique. Le même appareil m'a servi à effectuer des essais entre 15° et 100°; et ce sont les résultats de ces expériences qui font l'objet du présent mémoire.

I

ACTION DU MÉTHANAL SEC SUR LES SPORES DU « BACILLUS SUBTILIS ».

Avant de passer à l'exposé des résultats, je préciserai d'abord aussi nettement que possible les conditions expérimentales dans lesquelles je me suis placé.

Le microbe sur lequel j'opère est un subtilis vivace, donnant en 24 heures à 38° un voile abondant, gras et épais. On le cultive dans du bouillon de bœuf alcalin léger, placé sans précaution spéciale dans une cuvette en porcelaine. Le lendemain, il s'est formé un beau voile. La culture est additionnée de son volume d'eau, puis violemment secouée dans un flacon, afin de dissocier le voile autant que possible. Des morceaux de flanelle sont trempés dans ce liquide, égouttés, puis desséchés à la température ordinaire. Telle est la substance qui m'a servi dans toutes mes expériences. — Cette flanelle est ainsi recouverte de germes de subtilis, mais sans couche glaireuse ou albumineuse : bien que très chargée de spores, elle paraît peu différente, à l'œil et au toucher, du même tissu non contaminé. On la découpe en

1. PERDRIX, Transformation reversible du trioxyméthylène en méthanal. Application à l'étude de la stérilisation par le méthanal sec aux températures élevées. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XX, 1906, page 881.

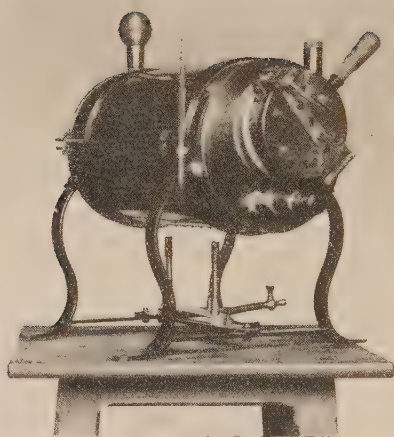


Fig. 1.

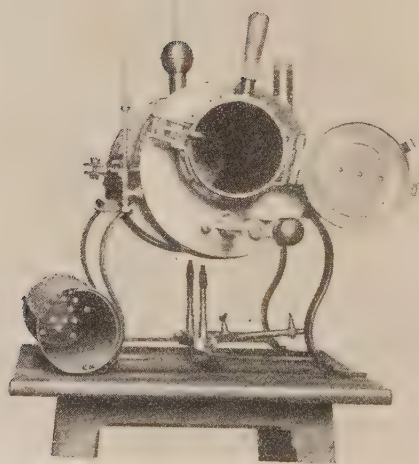


Fig. 2.

morceaux de 2 c² environ de superficie ; puis ceux-ci sont pliés en quatre dans de petits carrés de papier à filtre. Ces derniers sont ensuite empilés régulièrement 10 par 10 dans un autre morceau de ce même papier, qui est fermé et ficelé en croix de façon à former un paquet unique.

Ces paquets d'expérience sont introduits dans l'appareil à méthanal, pendant un temps déterminé et à la température choisie. On les abandonne ensuite 24 heures dans le laboratoire pour leur permettre de perdre par diffusion le gaz antiseptique dont ils sont imprégnés ; puis on les ouvre aseptiquement par l'une des extrémités. Chacun des petits paquets partiels est successivement extrait avec une pince flambée, puis introduit directement dans le tube à culture, où il s'ouvre de lui-même, mettant la flanelle au contact du bouillon stérilisé. Les tubes d'essais, maintenus à 38°, sont examinés chaque jour pendant six semaines.

J'ai indiqué dans mon premier mémoire (*loc. cit.*) que, la température de l'appareil d'exposition étant fixée, la tension du gaz méthanal est elle-même exactement déterminée. A 70°, par exemple, la tension maxima de l'aldéhyde est de 210^{mm}. Les résultats que je vais exposer ont toujours été obtenus en plaçant les spores en atmosphères ainsi saturées de méthanal.

La contamination certaine de la flanelle par un subtilis très résistant était manifestée par l'expérience suivante : des paquets furent chauffés à sec dans une étuve à 100°, *sans méthanal*, respectivement pendant 2, 5 et 10 heures. Après refroidissement, les petits morceaux de flanelle furent introduits aseptiquement dans du bouillon stérilisé.

Tous les tubes renfermant des spores chauffées 2 heures à 100° étaient altérés le lendemain et présentaient un voile très marqué. Après 5 heures de chauffe, tous furent encore contaminés, mais avec un léger retard : sur 10 tubes, 3 seulement étaient altérés le lendemain, 2 le surlendemain, et les 5 derniers le troisième jour. Après 10 heures de chauffe à 100°, les retards à la culture furent plus marqués ; mais tous les tubes subirent encore une altération au bout de quelques jours.

Ces expériences témoins montrent que les spores de subtilis sur lesquelles j'opérais résistaient plus de 10 heures à 100° en étuve sèche : il n'y avait donc aucun doute sur leur vitalité. Ce point étant acquis, il était possible d'opérer en toute sécurité et

par comparaison, en présence de méthanal saturé, aux différentes températures.

Les résultats sont consignés dans la série des tableaux suivants :

I. — *Température : 100°.*

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
2 minutes.....	10	10	100 0/0
3 —	10	9	90 —
4 —	10	3	30 —
5 —	10	0	»
6 —	10	0	»

II. — *Température : 90°.*

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
4 minutes.....	10	10	100 0/0
5 —	38	25	65 —
6 —	10	6	60 —
7 —	10	1	10 —
8 —	10	0	»
10 —	30	0	»
15 —	20	0	»
20 —	20	0	»

III. — *Température : 80°.*

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés
	En expérience.	Altérés	
3 minutes	40	40	100 0/0
6 —	10	7	70 —
8 —	10	10	100 —
9 —	40	3	30 —
10 —	26	10	38 —
12 —	20	10	50 —
15 —	20	4	5 —
20 —	37	7	19 —
22 —	40	0	»
25 —	20	0	»
30 —	40	0	»

IV. — *Température : 70°.*

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DE TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
4 minutes	40	40	100 0/0
8 —	40	40	100 —
12 —	40	40	100 —
15 —	30	19	63 —
20 —	20	3	15 —
25 —	30	8	26 —
30 —	30	5	16 —
45 —	40	0	»
1 heure	30	0	»
1 h. 15'	20	0	»
1 h. 30'	40	0	»

V. — *Température : 60°*

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DE TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
30 minutes.....	20	19	95 0/0
35 —	10	10	100 —
40 —	30	27	90 —
1 heure.....	20	9	45 —
1 h. 20'.....	20	11	55 —
1 h. 30'.....	10	4	40 —
1 h. 40'.....	20	0	»
2 heures.....	20	0	»
2 h. 30'.....	20	0	»
3 heures.....	10	0	»

VI. — *Température : 50°.*

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
30 minutes.....	10	10	100 0/0
35 —	10	10	100 —
40 —	20	18	90 —
45 —	10	6	60 —
1 heure.....	30	13	40 —
1 h. 30'.....	10	9	90 —
2 heures.....	10	8	80 —
3 h. 30'.....	10	2	20 —
4 heures.....	20	0	»
5 —	10	0	»
6 —	20	0	»
7 —	10	0	»

VII. — *Température : 40°.*

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
1 jour.....	20	2	10 0 0
2 jours.....	10	0	»
3 —	10	0	»
4 —	10	0	»
5 —	10	0	»
6 —	10	0	»

VIII. — *Température : 30°.*

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
1 jour.....	40	10	400 0 0
2 jours.....	40	4	40 —
3 —	20	1	5 —
4 —	20	0	»
5 —	20	0	»
6 —	10	0	»

IX. — *Température : 26°.*

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés
	En expérience.	Altérés.	
1 jour.....	40	10	400 0/0
2 jours.....	40	5	50 —
3 —	40	3	30 —
4 —	40	1	40 —
5 —	40	0	»
6 —	40	0	»

X. — *Température : 18°.*

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
2 jours	40	40	100 0/0
3 —	40	40	100 —
4 —	40	40	100 —
5 —	40	8	80 —
6 —	40	9	90 —

XI. — *Température : 45°.*

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
2 jours	40	40	100 0/0
3 —	40	40	100 —
4 —	40	40	100 —
5 —	40	7	70 —
6 —	40	7	70 —
7 —	40	7	70 —
9 —	40	3	30 —

Les tableaux précédents indiquent nettement la marche de la stérilisation aux différentes températures; mais il convient d'en rassembler les principaux résultats dans une vue d'ensemble et c'est le but du tableau général suivant (colonnes 3 et 4).

Tableau général représentant les durées nécessaires à la destruction des germes de subtilis aux diverses températures.

TEMPÉRATURE 1	DURÉES DE STÉRILISATION		LIMITE des cultures expérimentales. 4
	Calculées d'après la formule théorique. 2	Observées expérimentalement. 3	
100°	5 minutes.	5 minutes.	4 minutes.
90°	10 —	8 —	7 —
80°	22 —	22 —	20 —
70°	53 —	45 —	30 —
60°	2 h. 35'.	1 h. 40'.	1 h. 30'.
50°	8 h. 20'.	4 heures.	3 h. 35'.
40°	25 heures.	25 —	24 heures.
30°	3 jours 5 heures.	Plus de 3 jours.	3 jours.
26°	5 jours 9 heures.	5 jours.	4 —
18°	45 jours.	Plus de 6 jours.	90 0/0 à 6 jours.
15°	24 —	Plus de 9 jours.	30 0/0 à 9 —

Il est possible, jusqu'à un certain point, de coordonner tous ces résultats, en les rassemblant dans une formule empirique, qui serait la suivante :

$$D = \frac{17.107}{t T^2}$$

D exprimant la durée de la stérilisation en minutes, t la température de l'action et T la tension de transformation du trioxy-méthylène à cette température t . La colonne 2 du précédent tableau indique les durées calculées d'après cette formule.

Il serait illusoire d'ajouter à cette relation algébrique plus d'importance qu'il ne convient; il est évident qu'elle ne peut représenter intégralement les faits, l'action n'étant pas, *a priori*, absolument nulle à 0°. Il n'en est pas moins vrai qu'elle rassemble convenablement, entre 15° et 100°, les résultats expérimentaux.

Ce qui ressort de la façon la plus frappante de l'examen du tableau d'ensemble, c'est l'augmentation considérable de la durée nécessaire pour la stérilisation, au fur et à mesure que la température s'abaisse. S'il suffit de 5 minutes à 100° pour détruire

complètement les germes du subtilis, c'est par heures qu'il convient de compter à 60°, et par journées à 26°. Mes expériences ne laissent pas le moindre doute sur ce point : elles ont été effectuées en double, par deux séries complètes, à plusieurs mois d'intervalle, sur deux subtilis analogues, mais non identiques; et les conclusions ont été absolument semblables.

II

ACTION DU MÉTHANAL SATURÉ SEC, AUX DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES, SUR LES GERMES CONTENUS DANS L'EAU D'ÉGOUTS

L'eau d'égouts qui m'a servi dans les expériences que je vais relater ici a été prise, comme l'année dernière ¹, à l'Usine élévatoire du quai de Rive-Neuve, n° 23. Mais, s'il est un liquide de composition variable, c'est bien celui dont il s'agit : tandis que l'eau d'égouts de février 1906 ne contenait que quelques rares germes de subtilis, celle d'octobre en renfermait des proportions beaucoup plus considérables.

Des bandes de flanelle furent trempées dans cette eau d'égouts fraîche, égouttées et séchées; ce fut la matière employée dans les expériences.

Comme pour le subtilis, les germes furent essayés à sec, à 100°, sans méthanal (expérience témoin) :

3 paquets renfermant chacun 10 morceaux de flanelle contaminée furent chauffés à 100°, respectivement pendant 2, 5 et 10 heures. — Mis en tubes à la façon ordinaire, ils fournirent les résultats suivants :

Tous les paquets maintenus à 100° pendant une durée égale ou inférieure à 2 heures ne parurent nullement affectés par ce chauffage et donnèrent lieu à des cultures abondantes dès le lendemain. — Pour ceux qui avaient été portés 5 heures à 100°, il y avait déjà une action, manifestée par un retard très appréciable dans l'apparition des cultures : sur 10 tubes de contrôle, l'un commença à s'altérer le 11^e jour seulement, et les autres, sans exception, suivirent du 16^e au 20^e jour. — Après 10 heures de chauffe à 100°, le premier tube de contrôle ne présenta un commencement d'altération que le 17^e jour; les autres firent tous de même entre le 18^e et le 25^e jour. Dans tous les cas, les

1. *Ann. de l'Institut Pasteur. loc. cit.* — N° V, 1906, Page 888.

germes qui présentaient ainsi des résistances considérables à l'action de la chaleur seule étaient des subtilis.

Quoi qu'il en soit, les paquets directement infectés par l'eau d'égouts furent soumis aux mêmes essais que ceux qui étaient effectués avec les cultures de subtilis et dont les résultats sont exposés dans la première partie de ce mémoire. Les deux opérations étaient toujours faites en même temps et dans des conditions complètement identiques; elles étaient donc bien comparables.

Comme ces expériences sont moins fondamentales que celles de la première partie, je ne donnerai les résultats détaillés qu'à 100°, 26° et 15°. Pour les autres températures, j'indiquerai simplement le résumé général.

I. — Température : 100°.

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
20 secondes.....	40	40	100 0 0
40 —	40	40	100 —
1 minute.....	40	40 (<i>subt.</i>)	100 —
1 m. 20".....	40	3 (<i>subt.</i>)	30 —
1 — 40".....	40	2 (<i>subt.</i>)	20 —
2 minutes.....	20	0	»
2 m. 30".....	40	0	»
3 minutes.....	40	0	»

II. — Température : 26°.

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
1 jour.....	40	7 (<i>subt.</i>)	70 0/0
2 jours.....	40	3 (<i>subt.</i>)	30
3 —	40	0	»
4 —	40	0	»
5 —	40	0	»
6 —	40	0	»

III. — Température : 15°.

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
2 jours	10	10	100 0/0
3 —	10	10	100 —
4 —	10	4 (subl.).	40 —
5 —	10	0	»
6 —	10	0	»
7 —	10	0	»
9 —	10	0	»

Tableau général récapitulatif représentant, par comparaison, les durées nécessaires à la destruction des spores de subtilis et des germes de l'eau d'égouts.

TEMPÉRATURE	SUBTILIS		GERMES DE L'EAU D'ÉGOUTS	
	Durée de la stérilisation.	Dernière culture.	Durée de la stérilisation.	Dernière culture.
100°	5 minutes.	4 minutes.	2 minutes.	1 min. 40".
90°	8 —	7 —	4 —	3 minutes.
80°	22 —	20 —	10 —	8 —
70°	45 —	30 —	30 —	25 —
60°	1 h. 45'.	1 h. 30'.	50 —	40 —
50°	4 heures.	3 h. 30'.	3 heures.	2 h. 30'.
40°	25 —	24 heures.	24 heures.	Rien à 24 h.
26°	5 jours.	4 jours.	3 jours.	2 jours.
15°	Plus de 9 jours.	30 0/0 à 9 jours.	5 —	4 jours.

Ces résultats peuvent être résumés de la façon suivante : les spores de subtilis présentent au méthanal sec une résistance incomparablement plus marquée que les autres germes, et cela à toute température. — A 100°, après 40 ou 60 secondes d'expo-

sition seulement, il y a déjà dans les cultures un retard très accentué : celles-ci ne débutent que le 3^e ou le 4^e jour. — De plus, tous les germes qui échappent à la stérilisation à partir de 1 minute environ d'exposition au méthanal sec saturé à 100° sont uniquement des spores de subtilis. — Un examen attentif des tableaux ci-dessus et de la marche des cultures montre que les observations précédentes peuvent être généralisées pour toutes les températures.

III

PUISSANCE DE PÉNÉTRATION DU MÉTHANAL SATURÉ AUX TEMPÉRATURES ÉLEVÉES. — APPLICATION A LA DÉSINFECTION, A SEC, DES OBJETS SOLIDES.

Les conclusions du présent mémoire et de celui qui l'a précédé justifient l'emploi du méthanal pour la désinfection et même la stérilisation, à sec, des objets solides à haute température.

Il restait cependant, au point de vue pratique, à étudier d'un peu plus près la question de la pénétration de l'aldéhyde. J'ai déjà exposé ¹ que le pouvoir pénétrant de ce gaz, à haute température, est considérable. Cependant, si les objets sont enfermés, s'ils sont plus ou moins serrés ou compacts, il est évident *a priori* que le méthanal ne peut se disséminer instantanément en tous leurs points et qu'il doit en résulter un retard à l'action. Ce fait est d'ailleurs nettement manifesté par les expériences que j'ai décrites pour la température de 100°.

Des livrets contaminés, de la flanelle et du drap infectés par du subtilis, soumis à l'action directe du méthanal sec à 100°, ainsi que je l'ai indiqué dans mon premier mémoire (pages 889-890), ont été stérilisés en moins de 5 minutes ; avec la même flanelle en paquets de 10 morceaux enfermés, superposés et serrés, la limite de stérilisation est légèrement retardée : 5 minutes au lieu de 4 [voir ci-dessus].

J'ai cherché à préciser un peu plus cette question. Pour cela, il convenait de réaliser des conditions où la pénétration fût particulièrement difficile, et voici comment j'y suis arrivé :

1^{re} série d'expériences. — Un œuf est broyé tout entier, jaune et blanc, dans un mortier, et bien délayé avec 100^c environ de

1. *Ann. de l'Institut Pasteur, loc. cit.* — 1906. N° V. Pages 890 et suivantes

bouillon. Le liquide, placé dans une cuvette plate, est additionné d'une culture de subtilis impure.

Dans ce bouillon, j'introduis, dès l'origine, un large morceau de flanelle qui y baigne tout entier. Le tout est placé à l'étuve à 38°. — Dès le lendemain, il s'est formé un voile très abondant. Le surlendemain, la culture devient visqueuse et présente une odeur intense d'albumine putréfiée; le quatrième jour, elle est complètement sèche. — La flanelle est ainsi extrêmement contaminée; elle a une couleur jaune sale, une odeur forte et désagréable, un aspect rugueux et raccorni; elle a perdu toute souplesse et se tient comme un carton léger. — On la découpe alors en morceaux de 3 à 4 centimètres de longueur sur un centimètre de largeur. Chaque morceau est plié en quatre et enfermé dans du papier à filtre. — 10 de ces petits paquets élémentaires, de forme rectangulaire, sont assemblés comme toujours, par superposition, dans un grand morceau de papier à filtre, fortement tassés, et le tout est fermé et ficelé en croix.

Dans de telles conditions, la pénétration des gaz devait certainement être très difficile, d'abord à cause de la superposition des étoffes, mais surtout à cause de la couche glairo-albumineuse déposée sur la flanelle et dans ses pores, et de la quadruple application de cette couche dans chacun des petits paquets partiels.

Expérience. — 7 paquets d'ensemble sont mis au stérilisateur à 100° pendant des durées variant de 5 à 25 minutes. — On les abandonne ensuite 24 heures dans le laboratoire et on introduit les petits paquets partiels dans des tubes de bouillon stérilisé. A ce moment, leur odeur est fétide et encore très marquée : il ne semble pas que le méthanal saturé à 100° ait beaucoup agi comme désodorisant. Voici les résultats obtenus :

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
5 minutes.....	10	10	100 0 0
7 —	10	10	100 —
9 —	10	7	70 —
12 —	10	5	50 —
15 —	10	4	40 —
20 —	10	1	10 —
25 —	10	0	»

La pénétration du méthanal a donc été plus lente et plus pénible ; elle était cependant complète en 25 minutes. Le nombre des spores restées vivaces au bout de 20 minutes devait être très restreint, si l'on en juge par la faible proportion des tubes altérés (un seul) et le long retard à la culture (22 jours).

Aux températures un peu supérieures à 100°, l'action est encore beaucoup plus rapide : ces mêmes paquets, si difficiles à stériliser, ne résistent pas 5 minutes au méthanal sec saturé à 120°, ainsi que le montre l'expérience suivante :

Température : 120°.

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
5 minutes.....	10	0	»
7 —	10	0	»
9 —	10	0	»
12 —	10	0	»
15 —	10	0	»
20 —	10	0	»
25 —	10	0	»

Aux températures inférieures à 100°, la pénétration devient rapidement très difficile et même illusoire. Ainsi, à 90°, ces

mêmes paquets n'ont pu être stérilisés qu'en une heure au minimum. — A 80°, 3 heures étaient à peine suffisantes pour arriver au même résultat. — A partir de 70°, c'est par journées qu'il faut compter. — A 60°, 3 jours étaient insuffisants pour une stérilisation complète, et au-dessous de cette température, il m'a été impossible de fixer une limite, même approximative.

La diffusion du gaz antiseptique devient donc de plus en plus difficile au fur et à mesure que la température s'abaisse ; ce qui se comprend, le méthanal se rapprochant alors de son point de liquéfaction.

2^e Série d'expériences. — Essais de pénétration à travers la laine à matelas.

Un paquet de 10 petits morceaux de flanelle imprégnée de subtilis (chapitre I) a été entouré de laine à matelas, que l'on enroule et que l'on tasse avec soin autour de lui, de manière à bien le laisser au centre. On enferme complètement toute cette laine dans un papier à filtre et l'on ficelle en croix.

Une série de paquets semblables est soumise à l'action du méthanal saturé, à 100°, pendant des durées variant de 4 à 30 minutes. On les abandonne ensuite 24 heures dans le laboratoire et l'on met en tubes de bouillon stérilisé les petits paquets partiels correspondants. Voici les résultats obtenus :

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés.	
4 minutes	10	40	100 0/0
6 —	10	2	20 —
8 —	10	3	30 —
10 —	10	0	»
15 —	10	0	»
20 —	10	0	»
25 —	10	0	»
30 —	10	0	»

On voit que, dans ce cas, 10 minutes ont suffi pour la stérilisation. — A 120°, cette dernière était complète en moins de 5 minutes.

Les mêmes expériences ont été effectuées avec du kapock, substance qui est très employée depuis quelque temps, à cause de son prix, pour la confection des matelas et surtout des traversins.

Les résultats ont été identiques, et les voici :

DURÉE DU SÉJOUR dans le méthanal saturé.	NOMBRE DES TUBES		PROPORTION des tubes altérés.
	En expérience.	Altérés	
4 minutes	10	6	60 0/0
6 —	10	0	0
8 —	10	2	20 0/0
10 —	10	0	»
15 —	10	0	»
20 —	10	0	»
25 —	10	0	»
30 —	10	0	»

A 120°, 5 minutes suffisent encore pour produire une stérilisation complète.

IV

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Les résultats exposés dans le présent mémoire et dans celui qui l'a précédé fixent nettement la question de la stérilisation des germes microbiens, et du *Bacillus subtilis* en particulier, par le méthanal sec, aux différentes températures. Les durées nécessaires pour arriver à une stérilisation complète augmentent rapidement et régulièrement au fur et à mesure que la température s'abaisse. Cette régularité est même assez marquée pour que, malgré des écarts considérables allant de quelques minutes à plus de 10 jours, on puisse les représenter assez exactement par une formule algébrique.

D'autre part, cette étude fournit une idée nette des conditions dans lesquelles il convient de se placer pour l'emploi du méthanal comme antiseptique.

Aux températures ordinaires, s'il s'agit par exemple d'une désinfection d'appartement, il est illusoire de songer à obtenir une stérilisation absolue. La destruction intégrale des germes ne sera jamais réalisée; car il y aura nécessairement insuffisance, soit dans la saturation de l'atmosphère par le méthanal, soit dans la durée d'exposition, soit surtout dans la pénétration du gaz antiseptique dans les parties profondes des objets. Au point de vue pratique cependant, il conviendra de se placer dans les conditions les plus favorables à la destruction des microbes et, dans ce but, de tenir grand compte de la différence de rapidité d'action avec la température. Les expériences relatées ci-dessus montrent que, pour une stérilisation complète, s'il suffit de 25 heures à 40°, il faut 3 jours à 30° et plus de 10 jours à 15°. Si, par une généralisation logique, nous étendons à tous les germes et, en particulier, à ceux des microbes pathogènes les conclusions fournies par mes expériences, nous pouvons penser que, pour produire le même effet bactéricide, il faut beaucoup plus de temps à 15-18° qu'à 26-30°. D'où la conclusion suivante que l'hygiéniste devra toujours avoir présente à l'esprit : la désinfection d'un appartement par l'aldéhyde formique sera d'autant plus rapide que la température sera plus élevée; et, pratiquement, des différences relativement petites dans le degré se répercuteront d'une façon considérable sur le résultat. Le meilleur appareil à désinfection sera celui qui permettra d'élever le plus facilement la température et de fournir le plus sûrement l'aldéhyde, dans l'appartement, à une pression égale à la tension de transformation.

S'il s'agit d'objets solides susceptibles d'être portés sans détérioration aux températures élevées, tels que papiers, livres, instruments, tentures, étoffes, matelas, etc., la stérilisation et par suite la désinfection seront rapidement et facilement obtenues. A ces températures, et à condition d'opérer en atmosphère saturée de méthanal, la pénétration de l'aldéhyde est facile et par suite l'action très efficace.

J'ai déjà réalisé, sur ces principes, un appareil employé à la désinfection rapide des livrets de caisse d'épargne au moment des dépôts. Grâce à l'initiative de son président, M. Eugène Rostand, la Caisse d'épargne des Bouches-du-Rhône utilise dans ce but, depuis le commencement de février, des

stérilisateurs construits d'après mes indications. Ces appareils présentent une forme analogue à celle que j'ai décrite antérieurement ; ils n'en diffèrent que par la disposition du cylindre mobile formant *chambre d'exposition* des objets. Ce dernier, de 44 centimètres de diamètre, présente, ainsi que le tube fixe qui lui sert de support, des fentes longitudinales disposées de telle sorte que, en le manœuvrant de l'extérieur de droite à gauche ou de gauche à droite, autour de l'axe commun des deux cylindres, on puisse, à volonté et sans ouvrir, établir ou supprimer la communication entre la chambre centrale, où se produit le gaz antiseptique, et la chambre d'exposition. Une porte ferme cette dernière à l'avant et permet l'introduction et l'extraction des objets.

Au moment des dépôts, les livrets, au nombre de cinq à sept, sont placés séparément dans un panier cylindrique en toile métallique de dimensions convenables. On ouvre la porte, on introduit le panier et l'on ferme. Par un brusque mouvement de droite à gauche, on établit la communication entre les deux chambres. Deux minutes après environ, on fait la manœuvre inverse ; on ouvre et l'on remplace le panier par un autre. L'opération totale dure au maximum trois minutes : on désinfecte ainsi 140 livrets à l'heure. L'encre, le papier ne sont nullement altérés ; l'odeur de méthanal n'incommode pas : aucune personne (employé ou déposant) n'a fait d'observation à ce sujet.

En dehors des heures des dépôts, le même appareil est encore utilisé à la Caisse d'épargne des Bouches-du-Rhône pour la désinfection des bons de pain destinés aux indigents.

Des étuves de plus grandes dimensions et de formes différentes, fondées sur les mêmes principes, sont actuellement en construction ; elles réaliseront le but que je me suis proposé depuis l'origine de mes recherches : la stérilisation et, par suite, la désinfection rapide et à sec des objets solides.

Note complémentaire sur le microbe de la coqueluche

PAR LES D^{RS} J. BORDET ET O. GENGOU.

(Institut Pasteur de Bruxelles.)

Afin de faciliter la tâche aux bactériologistes qu'intéresseraient la culture et l'étude du microbe de la coqueluche, il ne sera pas inutile que nous complétions quelque peu les renseignements fournis dans notre premier article¹.

Les recherches que nous avons poursuivies depuis l'année dernière ont pleinement confirmé la conviction que nous avions cru pouvoir exprimer quant à l'authenticité du microbe décrit comme agent causal de la coqueluche. Nous ne reviendrons pas sur les arguments cités dans notre mémoire antérieur; bornons-nous à ajouter que le pouvoir sensibilisateur du sérum d'enfants convalescents de coqueluche s'est constamment manifesté, dans tous les cas soumis à l'épreuve, avec une remarquable énergie.

Le milieu de culture dont nous avons indiqué la préparation (mélange de sang de lapin et de gélose contenant un peu d'extrait glyciné de pommes de terre) nous paraît encore le mieux approprié² à l'isolement du microbe. Mais pour cette opération, le fait le plus important à connaître, c'est que le microbe de la coqueluche se développe, au moins dans la première culture, avec une certaine lenteur; les colonies exigent près de deux jours à l'étuve pour apparaître; aussi peuvent-elles rester très petites si le milieu n'est pas soigneusement préparé, ou bien s'il se dessèche, ou s'il se développe dans le tube des colonies assez nombreuses de microbes banaux qui s'accroissent rapidement et épuisent tout autour d'elles les principes nutritifs. En l'absence de ces circonstances défavorables, on peut, même dans la première culture, obtenir des colonies qui, si elles ne sont pas trop rapprochées, deviennent très prospères à l'étuve vers le troi-

1. Ces *Annales*, septembre 1906.

2. Une recommandation qui a son intérêt pour la réussite des cultures est la suivante : Lorsque, pour préparer le milieu de culture, on ajoute le sang défibriné au culot de gélose fondue, il convient d'agiter le mélange très soigneusement. En effet, le sang possède une densité notablement supérieure à celle de la gélose : si le mélange n'est pas bien intime, la partie supérieure peut être constituée de gélose mal imprégnée de sang, et former ainsi, lors de l'inclinaison ultérieure du tube qu'on laisse se refroidir, une surface médiocrement nutritive.

sième jour, et se distinguent en ce qu'elles sont blanches, saillantes, à bords très nettement circonscrits.

Certaines expectorations, particulièrement favorables, convenablement diluées et ensemencées sur le milieu nutritif, nous ont ainsi fourni des cultures presque pures, renfermant par exemple 100 ou 200 fois plus de colonies coquelucheuses que de colonies de microbes étrangers.

Nous avons, après nombre d'auteurs, signalé la fréquence dans l'expectoration coquelucheuse de microbes semblables à celui que Pfeiffer a décrit comme provoquant l'influenza¹, et mentionné ce fait que la présence de ces microbes constitue très souvent un sérieux obstacle à l'isolement du véritable parasite de la coqueluche. En effet, ils forment des colonies généralement très nombreuses, à développement rapide. Ces microbes ne s'agglutinent nullement sous l'influence du sérum de cheval immunisé contre le microbe coquelucheux, qui agglutine très énergiquement ce dernier; l'emploi de ce sérum permet une différenciation aisée et infaillible. Au microscope, ils sont souvent assez difficiles à distinguer du microbe coquelucheux lui-même². Mais il suffit de quelques cultures successives sur le milieu du sang pour distinguer sûrement les deux microorganismes. Lorsqu'on ensemence en strie assez étroite le microbe coquelucheux sur la surface gélose-sang, on

1. En réalité, au lieu de dire semblables, il nous paraît qu'on devrait plutôt dire identiques. En effet, nous avons cultivé parallèlement, pendant un temps assez long, les microbes de cette espèce provenant de cas de coqueluche, et le microbe typique de l'influenza, mis obligeamment à notre disposition par M. le Dr Cohen, qui lui-même l'avait obtenu du laboratoire de M. Pfeiffer. Or ces cultures comparatives ne nous ont révélé aucune différence perceptible entre les microbes considérés.

2. C'est vrai surtout pour les premières cultures obtenues. Toutefois, certains signes sont utiles à connaître. Quand on les délaie dans l'eau, en vue d'obtenir une préparation, les microbes-influenza donnent une émulsion ayant tendance à une légère agglutination spontanée, de sorte qu'en séchant sur la lame ils se groupent souvent en petits bouquets (voir par exemple la figure 1 planche IX de Jochmann et Krause, *Zeitschrift für Hygiene*, 1901); dans les préparations de coqueluche, les microbes restent mieux disséminés. Au bout de quelques cultures sur notre milieu (parfois même plus tôt), le microbe-influenza revêt souvent des formes grandes (parfois gonflées et contournées); la taille moyenne s'accroissant ainsi dépasse alors fréquemment celle de la coqueluche. Les bleus phéniqués colorent l'influenza d'une manière visiblement plus intense que la coqueluche. Rappelons que le repiquage sur gélose-ascite distingue bien les deux microbes; la coqueluche y forme (assez lentement) une trainée blanche épaisse; la culture du microbe-influenza, sans y être à vrai dire tout à fait nulle, reste beaucoup plus mince.

voit la couche microbienne s'épaissir et faire ainsi, au bout de 2 ou 3 jours, une assez forte saillie. Mais si elle gagne beaucoup en épaisseur, elle ne progresse guère en largeur, de telle sorte que les bords en sont fortement inclinés, presque à pic. Ensemencé de la même manière, le microbe de l'influenza donne une couche très notablement moins épaisse, qui s'élargit en formant des bords souvent festonnés, doucement inclinés, luisants et humides. D'autre part, la culture coquelucheuse est plus blanche, ne noircit jamais le milieu sanguin sous-jacent, tandis que l'influenza¹ modifie fréquemment le sang en lui donnant une teinte sombre. Lorsqu'on regarde par transparence la culture de coqueluche, on constate que la traînée de microbes apparaît comme une ligne plus claire que les parties contiguës du milieu nutritif qui n'ont pas été touchées par l'ensemencement. Cet éclaircissement du milieu tient à ce que les microbes ont hémolysé les globules sous-jacents et diminué ainsi l'opacité du substratum nutritif.

Nous avons insisté sur ce fait que les formes anormales, très fréquentes chez le microbe de l'influenza (qui souvent produit des bâtonnets ou filaments de grande taille, ayant tendance au gonflement, à l'irrégularité d'aspect et à la faible colorabilité) sont rares chez le microbe de la coqueluche, qui garde avec constance son aspect de petit coccobacille dont les dimensions toutefois, surtout dans les cultures un peu âgées, peuvent être très réduites. Il s'agit ici bien entendu des cultures sur le milieu solide; les cultures en milieu liquide, dont nous allons dire quelques mots, présentent un pléomorphisme plus accusé; les dimensions sont plus variables, la colorabilité plus inégale, souvent plus forte, la forme moins ovoïde.

Les cultures liquides réussissent facilement, à condition que l'on tienne compte des exigences remarquables que manifeste le microbe de la coqueluche au point de vue du contact avec l'atmosphère. Ce microorganisme ne prospère en effet que dans

1. Les microbes dont il s'agit (identiques ou très semblables à l'influenza) proviennent de cas de coqueluche, et concordent absolument, par tous leurs caractères, avec les microbes décrits par plusieurs de nos prédécesseurs, notamment Jochmann et Krause. Rappelons que pendant longtemps, au cours de nos recherches, notre attention (comme celle d'autres savants) a été vivement attirée vers ces microbes, que l'expectoration coquelucheuse fournissait presque constamment.

de très bonnes conditions d'aérobiose. Si l'on ensemence un tube à réactif contenant un liquide nutritif approprié s'élevant à quelques centimètres de hauteur, et si on le maintient à l'étuve en position verticale, le développement microbien ne se fait qu'avec lenteur et péniblement. Mais si on le couche en position presque horizontale, un trouble intense s'observe bientôt dans la partie du tube où le liquide est étalé en couche la plus mince. Aussi faut-il faire les cultures liquides en vase à fond large et plat, et y verser la quantité de liquide voulue pour que le niveau ne s'élève pas à plus d'un centimètre. On constitue un excellent milieu en mélangeant du bouillon peptonisé à 1 0/0, glycérimé à 1 0/0, avec partie égale de sérum de cheval (de préférence chauffé au préalable 3/4 d'heure à 57°). Dans ces conditions, le microbe pousse sans guère troubler le liquide: au bout de 4 à 5 jours (le développement est assez lent) le fond du vase est tapissé d'un dépôt blanchâtre un peu visqueux et assez épais. Le liquide se trouble davantage et le dépôt est moins cohérent lorsqu'au lieu de sérum de cheval (qui manifeste sur le microbe un certain pouvoir agglutinant) on emploie du sérum de lapin.

Lorsque au lieu d'employer, pour constituer le milieu de culture, du sérum de cheval normal (chauffé à 57°) on fait intervenir du sérum de cheval (également chauffé à 57°) immunisé contre le microbe, le développement se fait encore très bien. Mais les microbes s'agglutinent davantage et revêtent une morphologie plus anormale; ils poussent en streptobacilles ou même peuvent ressembler à des streptocoques en longues chaînettes, leur aspect est donc tout à fait aberrant et ne rappelle en rien celui si régulier qu'affecte le microbe sur le milieu solide.

On peut obtenir, par immunisation du cheval, un sérum extrêmement agglutinant¹. Si l'on émulsionne dans 2 à 3 c. c. de solution physiologique la couche microbienne développée au bout de 2 jours sur un tube de gélose-sang de dimension moyenne, on obtient (si l'on a soin de délayer les microbes d'abord dans très peu de solution, afin de les dissocier conve-

1. Le cheval a reçu, en une quinzaine d'injections successives pratiquées, la plupart sous la peau, quelques-unes dans les veines, une quantité totale d'environ 2 litres et demi de culture liquide bien riche (bouillon glycérimé et sérum de cheval neuf).

nablement) une suspension bien trouble, d'aspect très homogène, presque colloïdal. Or cette émulsion s'agglutine sous l'influence de traces de sérum actif; par exemple, on observe encore le phénomène, si l'on n'ajoute que 1/5000 de c. c. de sérum à 1 c. c. d'émulsion. Un excès trop considérable d'agglutinine nuit à l'intensité du phénomène; à cet égard, le microbe coquelucheux pourrait servir d'exemple pour l'étude du pouvoir empêchant, déjà signalé dans d'autres cas par divers observateurs, qu'exercent les doses trop fortes des immunsérums.

Les différentes souches de microbes coquelucheux qu'on peut se procurer aux dépens d'expectorations d'enfants atteints de la maladie ne sont pas également agglutinables. Ainsi, le sérum de notre cheval agglutine moins énergiquement le microbe qui a été employé à son immunisation, qu'un autre échantillon provenant d'un cas différent de coqueluche.

Nous avons espéré pouvoir pratiquer le sérodiagnostic de la coqueluche en recourant à la méthode si simple et si pratique de l'agglutination. Malheureusement le sérum des enfants atteints ou convalescents de coqueluche se montre très inconstant au point de vue de cette propriété. Elle existe souvent d'une manière manifeste, sans être pourtant d'une intensité bien remarquable; parfois même elle peut manquer presque totalement. On se trouve alors en présence de sérums qui, sans être nettement agglutinants, sont très fortement sensibilisateurs. Comme nous l'avons dit, la méthode de la fixation de l'alexine donne toujours des résultats positifs très accentués. Il y a donc dissociation des deux propriétés. Rappelons à ce propos que le sérum du convalescent de fièvre typhoïde avec lequel nous avons pour la première fois pratiqué l'essai de la fixation de l'alexine (1901) s'est montré fortement sensibilisateur sans être agglutinant, et ce fait a été assez souvent observé dans la suite. Au surplus, il y a longtemps que divers observateurs ont noté le manque de parallélisme nécessaire entre l'agglutination et le pouvoir bactéricide.

Nous avons signalé les accidents très visibles (irritation excessive, opacification de la cornée, etc.) qui surviennent lorsqu'on injecte dans la chambre antérieure de l'œil, chez le lapin, une trace d'expectoration contenant le microbe à l'état de pureté, ou bien encore un peu de culture sur milieu solide du

virus coquelucheux. On peut observer aussi des phénomènes remarquables en injectant le microbe dans le péritoine du cobaye¹. A vrai dire, il convient d'employer à cet effet non des cultures liquides (qui sont très peu actives) mais une émulsion dans la solution physiologique de culture solide sur gélose-sang, âgée de 2 — 3 jours. — Un poids faible de microbes (il suffit de 1 1/2 à 2 milligrammes, les microbes étant pesés à l'état humide) provoque la mort, le lendemain ou le surlendemain de l'injection. Chose remarquable, il ne s'agit pas d'infection, les microbes ne se reproduisant pour ainsi dire pas dans le péritoine; à l'autopsie, c'est à peine si on en découvre quelques-uns dans le liquide d'exsudat; parfois même tous ont été englobés par les phagocytes qui ont afflué en grand nombre. Mais on constate des phénomènes d'intoxication très accentués se traduisant par la production de pétéchies mouchetant de taches rouges les parois de la cavité, par une congestion des organes abdominaux, par de vastes épanchements (souvent teintés de rouge) de la cavité pleurale, parfois aussi de la cavité péricardique, par une congestion excessive des vaisseaux cardiaques. On constate aussi de la dégénérescence grasseuse du foie. Avant la mort, le symptôme le plus apparent que l'animal manifeste consiste en une très forte dyspnée, allant jusqu'au tirage, d'apparition assez précoce et qu'explique notamment l'exsudation pleurale. L'injection sous-cutanée donne de l'œdème.

Les émulsions de cultures solides dans la solution physiologique, tuées par le toluol ou le chauffage à 56° pendant une demi-heure, et injectées dans le péritoine des cobayes, amènent aussi la mort, en produisant les phénomènes d'intoxication, notamment l'intense épanchement pleural; cependant elles ne donnent guère lieu à des pétéchies. D'autre part, il en faut des doses plus fortes que lorsqu'il s'agit de microbes vivants. Le sérum de cheval immunisé, qui est si énergiquement agglutinant, ne possède qu'une vertu antitoxique médiocre; il faut en ajouter des doses assez fortes à l'émulsion microbienne pour que celle-ci puisse être injectée dans le péritoine sans amener la mort. Il convient de dire que nous ne possédons qu'un seul cheval immunisé, et que par conséquent nous devons garder une

1. L'injection dans le péritoine du lapin produit, à dose un peu plus forte, des effets identiques.

certaine réserve dans l'exposé des propriétés de l'immunsérum, l'efficacité éventuelle de celui-ci pouvant être variable suivant l'animal qui l'a fourni. — Néanmoins, il est fort probable que le sérum de chevaux immunisés contre le microbe de la coqueluche se range dans la même catégorie que le sérum antityphique et d'autres encore, lesquels, tout en manifestant d'une manière très prononcée certaines propriétés, telles que le pouvoir agglutinant, ne sont pas suffisamment antitoxiques. On devra évidemment tenter d'exalter cette dernière propriété; en effet, des essais assez nombreux pratiqués sur des enfants coquelucheux, avec le sérum dont il a été question, ont donné des résultats qui, parfois très perceptibles, n'étaient pas en général suffisamment accentués.

LE MICROBE DE LA COQUELUCHE

Remarques sur le travail de MM. J. Bordet et O. Gengou paru dans les *Annales de l'Institut Pasteur* (20^e vol., 1906, fasc. 9, pages 734-741), avec la pl. XVIII.

PAR LE D^r REYHER, DE BERLIN.

(Travail de la Clinique et Policlinique infantiles de la Charité, de Berlin.)

Dans ces *Annales*, Bordet et Gengou publièrent récemment les résultats de recherches ayant pour but de déterminer l'agent causal de la coqueluche. Après de longues observations (poursuivies pendant 6 ans environ), ils auraient découvert, disent-ils, le microbe spécifique de cette affection. De prime abord, ils repoussent la possibilité d'une identité de leur microbe avec l'un ou l'autre agent pathogène décrit précédemment. Ils attribuent l'insuccès des auteurs qui les ont précédés dans cette étude, à l'ignorance de certaines circonstances qui facilitent considérablement la recherche du microbe en question au milieu des germes qui peuplent les produits d'expectoration de la coqueluche.

Parmi ces circonstances favorables, l'une des plus importantes, d'après Bordet et Gengou, serait l'examen du produit d'expectoration, dès le début de la maladie ; car c'est à ce stade que l'on aurait le plus de chance de trouver le microbe inconnu en quantité suffisamment grande et, de plus, relativement peu mélangé avec d'autres germes banaux. Il faudrait, de plus, être certain que le produit examiné provient de la profondeur des bronches, de la région où siège très vraisemblablement l'agent microbien. Particulièrement précieux pour cette étude seraient les cas de coqueluche chez les tout jeunes enfants qui n'ont pas encore souffert d'affections des voies respiratoires supérieures et par suite possèdent peu de germes autres que les éléments spécifiques. C'est pour cette dernière raison qu'il serait avantageux de faire les observations sur des enfants traités en dehors de l'hôpital.

Dans quelques cas favorables, Bordet et Gengou auraient trouvé leur microbe de la coqueluche dans les crachats, en grande abondance et de plus presque à l'état pur, mais au stade primitif de l'affection seulement ; car dans la suite, malgré le grand nombre et l'intensité des quintes de toux, il devint de

plus en plus rare et disséminé au milieu d'autres germes de plus en plus nombreux. Au déclin de la maladie, il ne serait plus possible d'attribuer avec sûreté une influence étiologique au microbe supposé spécifique.

Parmi ces germes qui peuplent les produits expectorés au stade plus avancé, on rencontrerait souvent une bactérie dont la ressemblance avec celle de la coqueluche amènerait aisément une confusion. C'est un bacille ressemblant beaucoup à celui de l'influenza de Pfeiffer, que Jochmann et Krause ont en effet considéré comme l'agent causal de la coqueluche. Il existerait cependant entre ces deux bacilles certains caractères distinctifs.

Bordet et Gengou décrivent comme suit leur microbe : « une petite bactérie ayant la forme ovoïde, parfois un peu plus allongée, mais en général assez constante d'aspect, colorée en bleu (bleu phéniqué de Kühne) très pâle, le contour et surtout les extrémités se teignant toutefois avec plus d'intensité que le centre, disséminée sans ordre entre les cellules (lambeau recueilli lors de la première crise de toux caractéristique), quelquefois phagocytée...

« La grande majorité des microbes étaient isolés, quelques-uns placés deux par deux, bout à bout. Le Gram était négatif. La pullulation était d'une telle abondance et d'une pureté si parfaite qu'on ne pouvait se refuser à admettre une relation de causalité directe (chez cet enfant dont les bronches étaient atteintes pour la première fois) entre cette infection et l'apparition de la coqueluche. Mais le microbe se montra rebelle à toutes les tentatives que l'on fit pour le cultiver. »

Leurs essais de culture en milieux ordinaires et sur hémoglobine ont échoué. Mais avec un milieu nutritif spécial préparé par eux (v. remarque p. 734) ils obtiennent un résultat plus favorable : deux jours après l'ensemencement un examen très attentif leur fit découvrir quelques colonies en nombre très restreint et si petites qu'elles étaient à peine visibles ; une observation très attentive était absolument nécessaire pour les reconnaître à ce moment, mais ultérieurement elles continuèrent à se développer et devinrent de plus en plus évidentes.

Les deux auteurs s'étendent ensuite longuement sur les différences morphologiques (leur bacille est plus grand que le bacille de l'influenza) et les caractères distinctifs des cultures

qui permettent de reconnaître leur bacille de la coqueluche de celui de l'influenza. J'aurai l'occasion de revenir en détail sur cette question, tout à l'heure.

Ils exposent finalement dans leur travail des expériences faites sur des animaux et des recherches de sérologie, observations très intéressantes mais qui ne doivent pas entrer en considération ici.

Si, à certain point de vue, je me réjouis de ces communications de Bordet et Gengou, je ne puis cependant leur dissimuler qu'une notable partie de leurs observations ne sont plus absolument neuves. Je ne peux non plus leur épargner le reproche d'avoir incomplètement étudié la littérature de la question. Sinon, ils n'auraient certainement pas ignoré qu'à différentes reprises dans plusieurs publications ¹, dont ils ne font pas mention, j'ai attiré l'attention sur un microbe que je considère comme agent spécifique de la coqueluche avec beaucoup de vraisemblance; ils auraient pu reconnaître ainsi que ce bacille, décrit par moi, est absolument identique au leur. Sans aucun doute possible, cette identité doit être admise.

Je désire simplement attirer ici l'attention sur les points les plus importants; pour les détails, je renvoie le lecteur aux travaux ci-dessus désignés.

Déjà, dans mon premier travail (1903), j'ai fait remarquer que le germe, que je considérais comme l'agent probablement pathogène de la coqueluche, présentait une certaine ressemblance avec le bacille de Pfeiffer (les deux premières figures accompagnant ce travail sont une preuve à l'appui de cette opinion), mais que certains caractères absolument précis portant d'une part sur la grandeur des bacilles, d'autre part sur l'aspect de leurs cultures permettaient de les distinguer l'un de l'autre.

En ce qui concerne la première de ces différences, je me suis exprimé ainsi ² (I, p. 610) :

1. REYHER, Zur Actiologie und Pathogenese des Keuchhustens. *Jahrbuch f. Kinderheilkunde* 1903. 58. Bd. S. 605-632.

2. REYHER, Ein weiterer Beitrag zur Bakteriologie des Keuchhustens. *Charité-Annalen* 29. Jahrgang, 1905.

REYHER, *Bakteriologische Untersuchungen bei Keuchhusten*. Vortrag, gehalten auf der Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Meran, 1906.

REYHER, Zur Bakteriologie des Keuchhustens. Vortrag, gehalten in der Gesellschaft der Charité-Arzte in Berlin 1906. *Berliner Klin. Woch.* 1906, n° 36.

« Die Polbakterien sind deutlich grösser als die Influenza-bazillen. »

Quant à l'autre point, les essais de culture, et particulièrement la difficulté de cultiver le soi-disant bacille de la coqueluche, il est ainsi traité dans ce même travail (p. 609) :

« Dieses spärliche Aufgehn der Polbakterien fiel namentlich in einigen Fällen auf, in denen die Stäbchen ausserordentlich zahlreich im Sputumausstrich nachzuweisen waren... Auf jeden Fall ersieht man zur Genüge aus den bisherigen Kulturversuchen, wie schwer es ist, dieses fragliche Polbakterium zu kultivieren. »

Un second travail a eu spécialement pour objet : la présence de mes bactéries dans des coupes du larynx et particulièrement dans les cellules de l'épithélium plat de la région inter-arythénoïdienne.

Dans deux communications ultérieures, je me suis attaché à expliquer, en m'appuyant sur de nombreux micro-photogrammes, la diversité des opinions des auteurs. Cette diversité peut aisément se comprendre par la présence simultanée dans l'expectoration des coquelucheux des plus grandes bactéries colorées aux deux pôles, et des petits bacilles semblables à ceux de l'influenza. J'ai toujours soutenu dès le début, contre Jochmann notamment, que seul le premier de ces bacilles aurait une importance étiologique dans la coqueluche avec beaucoup de vraisemblance.

A cette occasion, j'ai insisté à nouveau sur l'extraordinaire difficulté de cultiver mes Polbactéries (Kultur ausserordentlich schwierig); les milieux nutritifs que j'utilisai me permirent d'obtenir seulement quelques rares et très petites colonies (nur vereinzelte und sehr winzige Kolonien).

Le maximum de longueur d'une de ces colonies ne dépassait pas 1,12 de millimètre et la plus grande largeur était d'environ 1/26 de millimètre. Cette extrême petitesse explique bien que les colonies aient pu passer inaperçues (Die enorme Kleinheit dieser Kolonien involviert die Möglichkeit, dass sie leicht übersehen werden können).

Comme Bordet et Gengou, mais avant eux, dans ces mêmes travaux que je viens de rappeler, j'ai signalé les principales différences entre le bacille semblable à celui de l'influenza qui

se trouve aussi dans les produits d'expectoration à la période convulsive de la maladie et le microbe supposé de la coqueluche.

J'ai exprimé ainsi les caractères morphologiques distinctifs de mon bacille :

« Dass er durchweg deutlich grösser ist als der « Influenza bazillus ». eine mehr gedrungene Form mit abgerundeten Enden darbietet und, sich auch mehr durch regelmässige Formen der einzelnen Individuen von den Influenzabazillen unterscheidet welche eine mehr polymorphe schlankere Gestalt mit oft zugespitzten Enden besassen. »

Au sujet des cultures ces bacilles de Pfeiffer se développent particulièrement bien sur l'agar arrosé de sang, tandis que le bacille de la coqueluche est très difficile à cultiver sur les milieux habituels et même sur l'agar arrosé de sang.

Il me reste à dire encore que Bordet et Gengou ne furent pas les premiers à examiner les produits d'expectoration au début de la coqueluche. Plusieurs fois, dans mes publications, j'ai comparé des préparations faites aux deux stades de l'affection : au stade catarrhal, les bactéries trouvées par moi sont généralement plus disséminées et en liberté, tandis qu'on les trouve plutôt dans les cellules plates de l'épithélium au stade convulsif.

Ceci prouve à l'évidence que j'ai examiné des crachats de coquelucheux dès le commencement de la maladie.

Enfin, cette remarque des deux auteurs qu'à la dernière période de la maladie le microbe en question ne peut être reconnu comme agent causal, je l'avais déjà exprimée dans ma première publication :

« Einige Mal musste ich bei der mikroskopischen Besichtigung von Sputumausstrich Präparaten von schweren Keuchhustenfällen längere Zeit vergeblich nach einzelnen Polbakterien suchen, bis ich plötzlich auf eine Stelle stiess, an der eine grössere Anzahl von mit den fraglichen Stäbchen vollgepfropften Pflattenzellen sich vorfand. »

J'ai donné également une explication de cette particularité.

De cet exposé il apparaît, en toute évidence, que mes recherches bactériologiques concordent absolument avec celles de Bordet et Gengou. abstraction faite de leurs recherches

sérologiques. A l'exception de ces dernières qui restent l'apanage de ces deux auteurs, je réclame donc la priorité d'avoir expliqué les résultats décrits.

Tout ce qui précède sera mieux mis en lumière par l'examen des microphotogrammes ci-joints, microphotogrammes qui ont été montrés déjà en partie au congrès de Meran en 1905 et en partie à la Société des médecins de la Charité à Berlin, au mois de mai 1906.

EXPLICATION DES FIGURES

Fig. 1. Préparation de l'exsudat de la coqueluche (stade convulsif) : une cellule plate de l'épithélium remplie du microbe coquelucheux. Grossissement 1 : 1.000.

Fig. 2. Préparation de l'expectoration de l'influenza, même grossissement (1 : 1.000). On voit que les bacilles de l'influenza sont plus petits que les bacilles supposés de la coqueluche.

Fig. 3. Préparation de l'exsudat de la coqueluche (stade catarrhal) : les microbes coquelucheux végètent presque à l'état pur ; ils sont plus disséminés et en liberté. Grossissement 1 : 800.

Fig. 4. Préparation de l'exsudat de la coqueluche (stade convulsif) : une cellule plate de l'épithélium remplie de microbes coquelucheux. A côté de cette cellule, au milieu de la préparation quelques bacilles plus petits, ressemblant aux bacilles de l'influenza. Grossissement 1 : 800.

Fig. 5. Préparation de l'expectoration de la coqueluche (stade convulsif) d'un cas où les quintes de toux étaient très graves : les crachats se signalent par beaucoup de cellules plates de l'épithélium. Faible grossissement.

Fig. 6. Préparation de l'expectoration de l'influenza.

Fig. 7. Préparation de l'expectoration de bronchite simple. Même grossissement que dans les figures 5 et 6. Les cellules manquent ou du moins elles sont très rares.

Fig. 8. Le microbe coquelucheux en culture de 24 heures sur sérum. Grossissement 1 : 1.000. Les bacilles sont plus grands que les bacilles de l'influenza, et de forme plus régulièrement ovoidale.

Fig. 9. Préparation d'une colonie du microbe coquelucheux (sur sérum). Grossissement 1 : 800. La colonie est très petite, presque invisible.

Fig. 10. Préparation d'une coupe du larynx, de la région interarythénoïdienne : beaucoup de microbes coquelucheux dans les cellules plates de l'épithélium de cette région.

LE MICROBE DE LA COQUELUCHE

Réponse à l'article précédent de M. Reyher.

PAR LES D^{rs} J. BORDET ET O. GENGOU.

Il eût été bien désirable, non pas pour nous, mais pour M. Reyher, que la réclamation de priorité qui précède n'eût point paru. En effet, la publication de cette note (on s'en convaincra en la comparant à notre premier mémoire sur la coqueluche) n'aura d'autre conséquence que d'exposer M. Reyher au jugement du lecteur pour ce qui concerne ses procédés de discussion, et d'attirer d'autre part l'attention sur l'imperfection de ses recherches scientifiques.

Mais M. Reyher a insisté pour que sa note vit le jour, et c'est pourquoi nous sommes forcés, à notre grand regret, de divulguer les incidents antérieurs à cette publication. Dès que nous apprîmes que M. Reyher prétendait avoir isolé avant nous un microbe identique au nôtre, nous pensâmes qu'en présence de cette affirmation, il convenait de cultiver parallèlement les deux microbes et de les comparer. Remarquons immédiatement que même s'il n'était point disposé à se fier à notre probité scientifique, M. Reyher ne courait aucun risque quelconque à nous envoyer sa culture, d'après lui identique à la nôtre. En nous faisant cet envoi, il ne nous donnait (en admettant bien entendu qu'il eût raison) absolument rien de nouveau, rien que nous ne possédions déjà : il se bornait à nous faire parvenir un microbe entièrement pareil, d'après ses propres dires, à celui que nous avions. Nous exprimâmes donc ces considérations à M. Reyher et lui demandâmes sa culture, lui promettant d'agir suivant l'une ou l'autre des deux alternatives suivantes : dans le cas où nous aurions constaté l'identité des deux microbes, nous l'aurions reconnue et déclarée ; dans le cas contraire, les deux cultures auraient été soumises, avec l'acquiescement

de M. Reyher, à l'examen de quelques bactériologistes éminents, choisis de commun accord, et qui se seraient prononcés. C'était, on le voit, très simple, et c'était loyal. Quelle que fût l'issue, la vérité était garantie; à supposer que la priorité de M. Reyher fût réelle, elle était infailliblement proclamée.

Mais M. Reyher déclina la proposition, refusant l'envoi de sa culture et formulant la volonté de publier sans retard. Nous en conclûmes, à bon droit, pensons-nous, que M. Reyher ne tenait guère à une enquête préalable. Il voulait réclamer. Il suffisait de lire la note de M. Reyher, note dans laquelle le parallèle entre les deux microbes porte sur quelques caractères judicieusement choisis, d'autres très essentiels étant soigneusement laissés dans l'ombre — sans doute parce qu'il aurait suffi de les citer pour ruiner la tentative d'identification, — note dans laquelle notre principal et indispensable argument en faveur de l'authenticité étiologique de notre microbe, l'activité spécifique du sérum d'enfants guéris, est jugé ne pas devoir entrer en ligne de compte dans la discussion, il suffisait, disons-nous, de parcourir la note de M. Reyher pour en apprécier l'allure tendancieuse. Le lecteur va d'ailleurs en juger.

Reprenons tout d'abord une citation que M. Reyher fait de son propre texte. Son bacille, dit-il, a ceci de commun avec le nôtre, qu'il se distingue du bacille de l'influenza par ses dimensions, sa forme trapue, ses bouts arrondis, « eine mehr gedrungene Form mit abgerundeten Enden... ,etc. ». — Or, une phrase presque pareille se retrouve en effet dans la dernière communication de M. Reyher ¹. La voici textuellement : « Während die auf allen Nährböden fortkommenden Bazillen eine mehr gleichmässige, gedrungene Form mit abgerundeten Enden darbieten, zeigen die vom Influenzabazillus nicht zu differenzierenden Stäbchen eine mehr polymorphe schlankere Gestalt mit oft zugespitzten Enden. » Mais il faut lire le reste de l'article. On s'aperçoit alors que le microbe de M. Reyher, qu'il considère maintenant comme identique au nôtre, était jugé alors par l'auteur comme étant identique au microbe de Czaplewski. Après un bref historique, on lit en effet (nous traduisons littéralement) : « Mes propres recherches

1, *Berliner Klin. Wochenschrift* 1906, n° XXXVI, page 1197.

bactériologiques m'ont conduit à ce résultat, que les deux types microbiens, celui de Czaplewski et celui de Jochmann, se rencontrent dans l'expectoration coquelucheuse, mais que la forme la plus grosse et la plus trapue (die grössere gedrungene Form) s'y trouve constamment, tandis que le microbe analogue à l'influenza (celui de Jochmann) ne se décèle que dans environ 70 à 80 0, 0 des cas ». Et quand M. Reyher ajoute ensuite que c'est la forme la plus grosse qui se rencontre dans les cellules épithéliales, c'est toujours du Polbakterium de Czaplewski qu'il est question, et c'est encore ce microbe qui, comme nous venons de le rappeler, est comparé par M. Reyher (voir sa citation) au microbe (voisin de l'influenza) de Jochmann. Notons en outre que si, comme il le dit, son microbe pousse difficilement (colonies rares et petites), il pousse néanmoins sur tous les milieux. Le nôtre, nous l'avons dit, ne pousse pas sur les milieux usuels (gélose-gélatine), il lui faut des albuminoïdes non coagulés.

C'est précisément parce que le *Centralblatt für Bakteriologie* rapportait ¹ que M. Reyher adoptait le microbe de Czaplewski, que nous ne l'avons pas cité. Citant M. Czaplewski, dont le microbe est sûrement différent du nôtre, nous jugions naturellement inutile de citer tous ceux qui se ralliaient à son avis. Il est vrai qu'actuellement, dans sa réclamation, M. Reyher ne fait plus du tout mention de M. Czaplewski.

M. Reyher l'a voulu, nous devons aller jusqu'au bout. — Il est certain que la description faite par plusieurs savants des formes qu'ils ont vues dans l'expectoration coquelucheuse rappelle parfois nettement celle de notre microbe ². Il est donc pos-

1. On lit au tome XXXV (1904), page 280, des *Referate* du *Centralblatt f. Bakt.* : REYHER PAUL : Zur Aetiologie des Keuchhustens, « Verf. hat an der Berliner Kinderklinik 34 Fälle von Keuchhusten untersucht. Es gelang ihm in allen Fällen das von Czaplewski beschriebene Polbakterium nachzuweisen. »

Dans les mêmes *Referate* (t. XXXVII, 1905, page 551, Compte rendu de la réunion des médecins à Meran), il est encore signalé que le Polbakterium de Czaplewski-Reyher donne peu de colonies, mais pousse sur tous les milieux. Pouvions-nous supposer que ce bacille se métamorphoserait au point de devenir identique au nôtre ?

2. Mais tant de coccobacilles se ressemblent ! Quand notre microbe et le bacille semblable à l'influenza sont mélangés dans l'expectoration, il est quasi impossible d'identifier avec certitude chaque individu qu'on aperçoit. Dans les cultures sur gélose-sang la forme de notre microbe et celle du choléra des poules se ressemblent souvent beaucoup.

sible que le vrai bacille de la coqueluche ait été aperçu dans le produit morbide, par plusieurs bactériologistes. Nous-mêmes l'y avons vu six ans avant de l'obtenir en culture. Mais quand il s'agit d'affections des voies respiratoires, où tant de germes peuvent se rencontrer (le microbe spécifique pouvant même, comme dans la tuberculose, être souvent moins nombreux que les espèces banales,) la question n'est pas de voir tel ou tel élément dans le produit pathologique; ce qui importe, c'est de l'obtenir en culture afin d'étudier son rôle et sa signification, c'est d'isoler le véritable agent et de fournir en sa faveur des arguments probants.

Ce qu'il faut comparer, ce sont donc les cultures. Or, de son microbe, M. Reyher n'a jamais pu obtenir (même sur le Blutagar) que des colonies rares et extrêmement petites (moins de 1/10 de millimètre). Le nôtre au contraire, s'il poussait difficilement dans la première culture (en raison de la lenteur de son développement, de la concurrence des germes banaux), a donné sans retard (dès qu'il a été retiré à l'état pur, c'est-à-dire 2 ou 3 jours après l'ensemencement de l'expectoration), une trainée blanche, luxuriante. Repiqué ensuite non seulement sur notre milieu, qui était nouveau, mais même sur un milieu connu et utilisé de tout le monde, la gélose-ascite, il y donna « une couche blanche, d'aspect gras et humide, devenant, après 2 à 3 jours, à peu près aussi épaisse que l'est une culture typhique sur gélose ordinaire ¹ ». Il se développe fort bien aussi dans des milieux liquides (bouillon-sérum) faciles à préparer. Et cette discordance saisissante des caractères de culture n'empêche pas M. Reyher d'affirmer l'identité des deux microbes !

Même incohérence au sujet du parallèle avec le bacille semblable à l'influenza. Dès qu'on opère avec des cultures purifiées, notre microbe végète plus abondamment que le microbe-influenza; le contraste est même saisissant. D'après M. Reyher lui-même, c'est le contraire pour son bacille qui est toujours très chétif même sur l'agar-sang. Et M. Reyher écrit néanmoins qu'il a, avant nous, signalé les principales différences entre le bacille de la coqueluche et l'influenza. C'est vrai, mais les diffé-

1. Voilà un caractère essentiel que M. Reyher laisse dans l'ombre.

rences qu'il signale sont précisément inverses de celles que nous avons consignées ¹.

Nous avons dit que notre microbe se trouve disséminé (à part l'englobement possible par les phagocytes) dans l'expectoration, à l'état libre. M. Reyher constate que le sien se trouve souvent dans les cellules épithéliales; jamais nous n'avons dit ni vu que ce fût le cas pour le nôtre. Encore une analogie.

On ne trouve, dans l'article de M. Reyher, rien qui concerne l'expérimentation sur les animaux.

Un mot encore à propos de nos recherches sérologiques qui, d'après M. Reyher, ne doivent pas entrer en considération ici. Sans elles, nous n'aurions rien publié. Dans l'état actuel des moyens d'investigation, elles étaient obligatoires autant que réalisables. Nous n'aurions pas voulu, en présentant un microbe (la coqueluche peut en fournir beaucoup d'espèces), nous borner à dire, comme M. Reyher, sans autre effort, qu'il est l'agent « vraisemblable » ou « très vraisemblable » de la maladie. Comme l'ont spontanément signalé MM. Metchnikoff et Roux, nous avons vu et coloré, bien avant Schaudinn, le spirochète de la syphilis, mais nos documents trop restreints ne nous ayant pas démontré son rôle avec la certitude voulue, l'observation resta inédite. Notre éminent et regretté collègue allemand sut réunir des présomptions plus nombreuses et plus fortes, — tant mieux. Pour la coqueluche, nous croyons avoir des preuves, M. Reyher n'en a jamais eu. Nous nous permettons de ne pas croire qu'un bactériologiste puisse négliger d'éprouver l'action du sérum d'enfants guéris sur le microbe qu'il isole, omettant ainsi d'appliquer à cet effet des méthodes connues depuis plusieurs années; nous devons donc admettre que M. Reyher n'a eu que des résultats négatifs (une observation positive eût certes été signalée), que le sérum en cause est sans action sur son microbe et qu'en conséquence ce dernier est différent du nôtre.

Inutile de nous résumer. Notre attitude d'une part, les caractères des cultures en jeu, etc., de l'autre, apparaissent suffisamment. Que M. Reyher maintienne ses affirmations en disant que

1. Quant aux dimensions, comparées à celle de l'influenza, on sait que presque tous les microbes connus sont plus grands que ce dernier. Presque tous ont donc ce caractère commun. La supériorité de taille de notre microbe sur l'influenza est minime; c'est encore un microbe très petit.

s'il n'a pu obtenir, comme nous, un développement du microbe en couche épaisse, c'est qu'il n'a pas su le faire pousser convenablement ; que s'il n'a pas signalé l'action du sérum de sujets guéris, c'est qu'il ignorait les méthodes ; que s'il n'a pas expérimenté sur les animaux, c'est qu'il n'y a pas pensé, etc... — c'est son droit. Mais nous estimons, en terminant cette longue discussion, que les colonnes de ces *Annales*, notre temps, et sûrement aussi celui de M. Reyher, auraient pu être plus utilement employés.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU SURRA D'INDO-CHINE

PAR H. SCHEIN

Inspecteur des Epizooties en Annam, chargé du service vétérinaire à l'Institut Pasteur de Nhatrang.

Travail de l'Institut Pasteur de Nhatrang.

Depuis que L.-F. Blanchard, en 1888, décrivit, sans le déterminer, le parasite qui va nous occuper, nombreux sont les observateurs qui ont étudié la maladie qu'il provoque. Mais, jusqu'aux derniers travaux de MM. Vassal, Laveran et Mesnil¹, régnait une certaine incertitude sur sa place dans la classification. Ces savants complètent, coordonnent les données antérieures, classent la maladie.

D'après eux, nous attribuons le nom de « Surra » à la trypanosomiase des mammifères de cette contrée, qui, en pratique, tue presque exclusivement les équidés.

Par cette désignation « Surra », nous n'entendons pas identifier la trypanosomiase d'Indo-Chine avec celle de l'Hindoustan ou de Maurice. Pour nous, « Surra » désigne un groupe de maladies voisines, dont le « Surra d'Indo-Chine » est un des composants.

I. — TRYPANOSOMIASÉ DU CHEVAL

Le Surra a été constaté d'une façon précise dans un certain nombre de provinces d'Indo-Chine, les plus diverses et les plus éloignées les unes des autres : Hatien, à l'extrême sud de la Cochinchine, Viétri, au nord de Hanoï, au Tonkin. Dans d'autres localités, des épizooties, dont la nature n'a pu être déterminée rigoureusement, à cause de l'éloignement, sont logiquement attribuables à cette affection. Tout entière, l'Indo-Chine doit être prise.

Nous avons pu étudier comparativement des trypanosomes ayant les origines suivantes : vallée de Nhatrang (épizooties de 1904 et de 1905), Hanoï (1905), province du Darlac (1906), Hué (1906). Les épizooties de Nhatrang et celles du Darlac ont été étudiées sur place. Nous avons pu suivre les symptômes

1. *Ann. Inst. Pasteur*, t. XX, avril 1907.

et la marche de la maladie chez les chevaux frappés par la contagion naturelle.

Dans l'ensemble, nous n'avons pas trouvé de différence avec les symptômes trop souvent décrits, pour que nous les reprenions en détail. Au début, l'exercice provoque rapidement de l'essoufflement, l'animal devient mou et ne peut bientôt plus travailler. — Amaigrissement rapide, tristesse, et un peu de somnolence. — Peau sèche, chaude, poil piqué. — La respiration, précipitée, irrégulière, discordante ou soubresautante, entrecoupée, montre parfois le rythme de Cheynes-Stokes. — Pouls vite, petit. Rien à la percussion ni à l'auscultation du thorax. — Muqueuses blanchies, livides. — Température irrégulière, souvent presque normale, subissant par intervalles de fortes poussées. — Symptômes oculaires assez rares : conjonctivite et kératite. — Œdèmes inconstants, à siège variable aux parties déclives. — Parfois, véritable parésie du train postérieur, et mort après une dernière période d'hyperthermie. Les lésions trouvées à l'autopsie sont les plus vagues : anémie intense, hypertrophie de la rate, moelle osseuse embryonnaire retournant au type fœtal.

Pendant le cours de la maladie, le nombre des parasites de la circulation générale varie sans cesse : d'abord fort petit, ce nombre augmente graduellement, passe par un maximum : à ce moment, l'organisme semble réagir pour se débarrasser des trypanosomes : la fièvre s'allume pendant deux, trois jours, et le nombre d'hématozoaires décroît considérablement, puis la température redevient presque normale.

Ces véritables « crises » sont au nombre de 3 ou 4 au cours de la maladie. Rarement des sujets — probablement en état de moindre résistance — succombent dès la première.

Pendant ces périodes critiques, l'urine est chargée d'albumine, alors que nous n'en avons pas constaté dans les intervalles.

Chaque crise épuise davantage le malade, il meurt après une dernière, ne présentant plus quelquefois que peu de parasites. Souvent même l'inoculation du sang des victimes aux animaux sensibles reste infructueuse : les trypanosomes disparaissent alors complètement.

MM. Brau, Saint-Sernin et Mutin-Boudet¹ ont divisé la maladie en deux formes : une forme « œdémateuse » grave, emportant l'animal en 30-45 jours, et une forme « sèche », plus lente, ne tuant qu'en deux mois, deux mois et demi.

Nous n'avons pu faire cette distinction. Au cours de la maladie, nous avons presque toujours noté des œdèmes, parfois fugaces, mais leur présence n'impliquait nullement une évolution plus rapide. Un des animaux observés (épizootie de Ban-Tour, au Darlac) a mis 4 mois $1/2$ à succomber, c'est probablement la durée la plus longue constatée à ce jour et cet animal a présenté un très fort œdème ventral.

Suivant les épizooties, de grandes variations peuvent se constater dans la virulence des trypanosomes. Dans la province du Darlac, existaient deux foyers de maladie, éloignés l'un de l'autre de 65 kilomètres de sentiers peu praticables, et ne communiquant jamais, étant habités par des tribus Moïs différentes de langue et d'habitudes. C'étaient les foyers de Ban Don et de Ban Tour.

Le parasite du premier foyer, très virulent, tuait les animaux en 1 mois $1/2$.

Dans le second, les animaux n'ont succombé qu'en 4 mois $1/2$ et 3 mois. Le sang du cheval qui devait succomber en 4 mois $1/2$ a été inoculé à un chien (dose, 2 c.c.) et à deux rats ($1/2$ c.c. chacun) 15 jours avant la mort du sujet, à un moment où les parasites étaient nombreux (5-6 par champ). 20 jours après l'inoculation, le chien n'avait pas présenté de parasites, mais, à ce moment, il s'est malencontreusement échappé et n'a pu être repris. Les 2 rats sont morts en 28 et 31 jours, sans que l'examen journalier de leur sang nous ait montré de parasite.

Les trypanosomes du foyer de Ban Don, rapportés au laboratoire sur des cobayes, ont tué le chien en 12-15-23 jours. Les rats succombaient en 9-10-15 jours.

Sur les préparations colorées au Giemsa, les parasites des deux foyers étaient morphologiquement indistinguables.

Nous avons adopté, pour les mensurations, les coordonnées proposées par Lingard² :

1. *Bull. Chambre d'Agric. de Cochinchine*, 9^e année, 1906. — Voir *Bull. Inst. Pasteur*, t. IV, p. 674.

2. *Journal of tropical veterinary, science*. Janv. 1906, p. 5 à 14.

- a.* Distance entre l'extrémité postérieure et le centrosome;
b. Distance entre le centrosome et le bord postérieur du noyau;
c. Distance entre les bords postérieur et antérieur du noyau;
d. Distance entre le bord antérieur du noyau et l'extrémité antérieure du corps.
e. Longueur de la partie libre du flagelle;
f. Largeur maxima du corps.

Les dimensions des parasites varient suivant leur âge : en effet, après une scission longitudinale, chacun des flagellés fils est moitié moins large que le parasite père ; ils augmentent de largeur jusqu'à une nouvelle scission. En outre, au moment de la division, les centrosomes sont rapprochés du noyau pour s'en écarter peu à peu ensuite. Il est nécessaire de ne comparer, autant que possible, des parasites adultes, chez la même espèce d'animal.

Dans ces conditions, les parasites de toutes les origines indo-chinoises que nous avons pu comparer, n'offraient que des variations peu importantes, moindres que celles que l'on peut trouver entre deux parasites sur une même préparation.

Le tableau ci-après en donnera une bonne idée.

Animaux.	Cobaye 6. Vir. N. T.	Cobaye S. 2. Virus Ng. Duoc	Cobaye 8 bis. Virus Ban Don	Chien. Virus Ban-Don, 19 décembre 06.			Chiende M. Merle Virus Hué.	Cob. 4. Virus Hanoï 31 oct. 05	Cob. 2. Virus Hanoï. 9 août 05	Cobaye Virus Ban Don
Dates.	17 oct. 05									
<i>a</i>	2,4	2,0	1,1	3	2, 1	4,6	2,8	3,2	2	2,1
<i>b</i>	5,8	6,4	5,8	7	6,0	5	8,0	5,6	6 2	5,7
<i>c</i>	3,0	2,5	2,3	3	2,5	1,5	3,2	2,4	2,4	3,2
<i>d</i>	9,5	9,2	7,5	8	7 3	6	6,4	8,1	7,3	8,6
<i>e</i>	7,4	8	10	10	9,7	5	8,8	9	8,8	9,5
<i>f</i>	2,7	3	2,4		2,5	1,5	2,5	3,2	3,2	3,0
Observations.			Les formes jeunes prédo- minant.	Maximum absolu.		Minimum absolu.	Formes jeunes nom- breuses			

La virulence pour les animaux de laboratoire était à peu près semblable, mettant à part celles de Ban Tour, dont l'étude a été interrompue, et celle de Hué, dont nous n'avons eu que des préparations dues à l'obligeance de M. Bauche.

Tableau montrant les délais de mort (en jours) des animaux inoculés.

VIRUS	COBAYES	LAPINS	RATS	CHIEN
Nhatrang 1905.	93-57-27 36-47-43	42	9-11	28
Hanoi 1905	23-37 47-37	6 j. (Montrait des T.)	8-10-13	23
Ban-Don.....	40-23-47-19 47-42-6	22-41	9-10-13	41-44
Nguyen-Duoc.....	49-45-46	22-40-6-23	7	22

L'animal de passage était le cobaye, dans tous les cas ci-dessus, sauf pour Nguyen Duoc, où nous nous sommes servi du lapin.

Il semble que le trypanosome acquière plus de virulence, par des passages répétés, pour l'animal choisi. Les chiffres ci-dessus étant donnés par ordre d'inoculations successives, semblent bien le prouver.

*
* *

Jamais, au cours des différentes épizooties de Surra, nous n'avons pu trouver d'autres malades que des chevaux. Nous avons pourtant pu constater, en même temps, deux cas spontanés de Surra chez le chien de race indigène. Mais c'était à Nhatrang même, et les animaux avaient pu pénétrer dans la salle d'autopsie et se repaître de cadavres d'animaux morts, probablement de lapins.

L'un d'eux, qui nous appartenait, a succombé 20 jours après

le début des accidents, dont nous avons immédiatement reconnu la nature. Un traitement au trypanroth et à l'arsénite de soude n'a pas eu d'effet appréciable. L'animal a présenté, sur la fin, de la conjonctivite et de la kératite, alors qu'aucun de nos nombreux chiens d'expérience n'a montré d'accidents oculaires.

L'autre chien, appartenant à un indigène, n'a pu être suivi de près : il a présenté des parasites, et a succombé une vingtaine de jours après.

Nous incriminons les cadavres de lapins pour ces deux contaminations accidentelles. Comme tous les expérimentateurs nous avons constaté que le sang du cheval, après la mort naturelle de Surra, se montre assez rarement virulent, ainsi que celui du cobaye. Le sang d'un rat ayant succombé montre, le plus souvent, de très nombreux trypanosomes, à tous les stades de dégénérescence, et transmet infidèlement la maladie avec de longs retards d'incubation. Au contraire, le sang de lapins, pris dans les mêmes conditions, montre d'ordinaire des trypanosomes, peu nombreux, mais vivants, bien mobiles et communique le Surra dans les délais normaux.

II. — TRYPANOSOMIASE CHEZ LE BOEUF.

Le 31 août 1906, en dehors de toute épizootie de Surra, deux bœufs mouraient chez un nommé Nguyen Duoc, au village de Phu-An, à 8 kilomètres de Nhatrang. C'est dans les maisons avoisinant celle de Nguyen Duoc que sévit l'épizootie de Surra de 1904.

Au moment de la mort de ces bœufs, il y avait eu plusieurs cas de charbon chez le cheval et chez le bœuf, aux environs immédiats de Nhatrang.

M. Bauche, inspecteur des épizooties, se rendit à Phu-An, pratiqua l'autopsie des animaux sans trouver de lésions nettes, et rapporta au laboratoire préparations et pipettes de sang.

L'autopsie ayant été tardive, on trouva des bactéries banales (septique-staphylocoque, bactéries ovoïdes); on ne rencontra pas de trypanosomes.

On inocula, avec le sang de chaque bœuf, deux cobayes et

un lapin. Dès le lendemain, les quatre cobayes moururent d'infection septique, les lapins survécurent. Mais, le 22 septembre (22 jours après l'inoculation) un des lapins mourut, présentant des trypanosomes; l'autre lapin n'eut jamais rien.

Au moins l'un des deux bœufs de Nguyen Duoc était donc infecté de trypanosomiase. On fit avec ce premier lapin une série de passages et d'inoculations; la virulence était en tout comparable à celle des épizooties de Nhatrang 1904 et 1905. Les dimensions étaient aussi analogues. (Voir les tableaux ci-dessus.)

Il fallait savoir si les autres bovidés habitant les environs de cet ancien foyer hébergeaient des hématozoaires. Avec 2 c. c. de sang de chaque Ruminant habitant les étables situées dans un rayon d'environ 500 mètres autour de l'étable de Nguyen Duoc, nous inoculâmes deux rats. Ce fut en vain, nous n'avons pu mettre aucun parasite en évidence. Le cas du bœuf de Nguyen Duoc devait être isolé, le dernier d'une série de contaminations sans accidents visibles se poursuivant en silence chez les Ruminants depuis l'épizootie 1904.

III. — TRYPANOSOMIASSE DU BUFFLE.

M. Vassal a montré que le buffle d'Indo-Chine, peu sensible à la trypanosomiase, présentait longtemps dans son sang les parasites inoculés. Le bufflon dont il relate l'histoire a porté des Trypanosomes pendant cinq mois, du 7 janvier au 24 juin 1905. Le 5 octobre, le sang de cet animal se montrait avirulent. C'est à ce moment que M. Vassal termine l'intéressante observation de ce sujet.

Le 26 mars 1906, nous inoculâmes 20 c. c. de son sang à un chien, qui resta indemne. Les parasites n'avaient pas reparu.

Le 11 septembre, le bufflon reçut 5 c. c. de sang, riche en Flagellés, venant d'un chien porteur de notre virus de Ban Don.

Les 18-19-20, l'animal eut une hyperthermie passagère, ce fut tout. Son poids, de 169 kilogs à la fin de l'expérience de M. Vassal, était de 191 au début de la nôtre: il a passé par un maximum de 198, et il est retombé à 197 le 2 janvier. L'appéti

a toujours été bon; l'examen direct du sang, fait tous les deux jours, n'a jamais montré de parasites. Mais, en revanche, ce sang s'est constamment montré infectant pour le rat du 19 septembre au 29 décembre: les rats inoculés à partir du 21 janvier 1907 n'ont plus été contaminés.

Un des rats inoculés le 29 décembre — rat B. 44 — est mort trois jours après, sans montrer de parasites, mais son congénère (B. 43) a présenté pour la première fois des Trypanosomes le 6 janvier (après *huit jours* d'incubation); on en trouvait un pour huit champs, puis le 7 même fréquence, plus rares le 10 (1 pour trente champ), augmentant le 12 (1 pour 15), nombreux le 14 (2 par champ), plus encore le 16 (4 par champ), ont diminué le 17 (2 par champs) et ont disparu le 19. — Après ce jour, on n'a plus revu de parasites. Il s'agissait bien de *T. Evansi*, préparations fraîches et colorées étaient univoques.

B. 43 n'a succombé que le 2 février (trente-cinq jours après l'inoculation). On n'a pas retrouvé de parasites sur le cadavre. Les rats, on le sait, supportent fort mal la captivité. Il n'est pas rare de voir des rats, non inoculés, succomber vingt jours après leur capture,

Le tableau suivant montrera que, dans l'ensemble, le trypanosome tuait le rat de moins en moins vite, au fur et à mesure qu'il vieillissait sur le bufflon.

Épreuve des rats par le sang du bufflon.

NOS DES RATS	DATE D'INOCULATION	DATE DE MORT	DÉLAI	OBSERVATIONS
1	19 septembre.	25 septembre.	6 jours.	Mort accidentelle. (Pas vu T.).
2	»	25 septembre.	6 —	
B. 4	29 septembre.	2 octobre.	3 —	
B. 2	»	8 octobre.	9 —	
B. 3	6 octobre.	19 octobre.	13 —	
B. 4	»	20 octobre.	14 —	
B. 5	25 octobre.	13 novembre.	18 —	
P. 6	»	7 novembre.	12 —	
B. 7	13 novembre.	23 novembre.	10 —	
B. 8	»	23 novembre.	10 —	
B. 9	23 novembre.	7 décembre.	14 —	Mort accidentelle. Jamais vu de T
B. 10	»	3 décembre.	10 —	
B. 11	12 décembre.	27 décembre.	15 —	
B. 12	»	26 décembre.	14 —	
B. 13	29 décembre.	2 février	35 —	
B. 14	»	1 ^{er} janvier.	3 —	
B. 15	21 janvier.	4 février.	14 —	
B. 16	»	9 février.	19 —	
B. 17	9 février.	25 février.	16 —	
B. 18	»	26 février.	17 —	

Rapprochant ces faits de l'histoire des trypanosomes de Ban Tour, nous sommes naturellement conduit à penser, avec M. Mesnil ¹, que les différences observées tiennent à la « généalogie » des trypanosomes, et à ne pas attribuer trop d'importance à la virulence des Trypanosomes pour leur classification.

Le buffle n'est pas immunisé par une première atteinte de Surra. Un parasite de virulence plus grande, ou d'origine

1. *Bull. Inst. Pasteur*, t. II, p. 917, et t. IV, p. 454, Analyses des travaux de A. SCHILLING et de THEILER, par F. MESNIL.

différente, peut encore le contaminer à nouveau et faire de lui, pour de longs mois, un redoutable réservoir de virus, ce qui augmente considérablement le danger qu'offre cet animal dans la transmission du Surra.

Notre ami, M. Bauche, vient de remarquer, dans l'épizootie de Hué, que les seuls chevaux atteints étaient les poulinières et les poulains qu'on laissait librement pâturer le jour, alors que leurs congénères, chevaux d'attelage, restant toute la journée à l'écurie ou n'en sortant que pour le travail, n'étaient pas atteints. Pourtant, en Indo-Chine, les écuries sont largement ouvertes, et les bêtes reproductrices partageaient, la nuit, le logement des animaux indemnes. Mais l'écurie des bestiaux était éloignée.

Cette constatation nous a frappé; nous avons retrouvé, dans nos notes, que dans l'épizootie de Surra qui a sévi dans les écuries de l'Institut (Suoi-Giao, en 1905), *aucun* des huit chevaux d'attelage, restant à l'écurie, n'a été atteint, alors que sur 87 chevaux allant pâturer, 48 avaient succombé (20 0/0). Là aussi, l'étable des buffles était éloignée.

Les pâturages ne sont ni très étendus ni très plantureux, en Indo-Chine; buffles, bœufs, chevaux, voisinent sans cesse. Les diptères sanguicoles, voletant des uns aux autres, peuvent aisément communiquer la maladie.

Au sujet de l'épizootie qui a sévi dans la province de Ninh-Binh (octobre 1905) notre distingué confrère, M. Bodin écrivait¹:

« Les bœufs et les buffles de l'exploitation, en contact constant avec les chevaux, n'ont pas été éprouvés, et ont été piqués, sans aucun doute, par des mouches ou taons infectés, il semblerait que ces animaux se soient montrés réfractaires à la maladie... »

Ces lignes, écrites avant la publication du travail de M. Vassal, donnent, par antithèse, la clef de la contamination des chevaux.

Toujours, dans toutes les épizooties que nous avons vues ou qui ont été relatées, il y avait eu ce contact des équidés malades et des grands Ruminants domestiques. Ainsi que le pense Pease², pour l'Hindoustan, le buffle joue « un rôle

1. *Bulletin économique Indo-Chine*, Octobre 1904, p. 46.

2. *Journ. of. trop. vet. sc.*, 1906, p. 70-91-127-129.

important dans la propagation du Surra ». Tous les faits exposés nous permettent de généraliser et de dire que les grands Ruminants jouent un rôle considérable.

La prophylaxie du Surra nous en semble précisée et simplifiée.

IV. — EXPÉRIENCES DIVERSES.

Albuminurie. — Les juments 14-16-21 de Suoi-Giao, atteintes, en 1905, de trypanosomiase spontanée, présentent de nombreux parasites. Leur urine, éprouvée par la chaleur et l'acide nitrique, contenait une forte proportion d'albumine, sans sucre ni pigments biliaires. Elles ont succombé après cette poussée.

La jument 28 a présenté quelques poussées de trypanosomiase. Le 17 décembre 1905, les trypanosomes sont rares (1 pour 5 champs). On ne trouve pas d'albumine dans l'urine. Le 20 décembre : examen du sang négatif; pas d'albumine.

Le 23 : trypanosomes nombreux (2 par champ) l'urine coagule par la chaleur et l'acide azotique. On ne trouve ni sucre ni pigments biliaires.

Le 25 décembre : le nombre des trypanosomes décroît; on ne trouve pas d'albumine.

Le 28 : la jument meurt à 5 heures du matin. Les parasites ont disparu. L'urine n'est plus albumineuse.

Cette albuminurie doit être en rapport avec les lésions de néphrite parenchymateuse subaiguë signalées par A. Mas-saglia¹. Mais elle semble aussi liée avec les « crises » traversées par l'organisme, au moment des pullulations de l'hématozoaire.

Salive. — La jument 31 présente de nombreux trypanosomes le 16 novembre 1905. On lui injecte 0 gr. 05 de nitrate de pilocarpine. Cinq minutes après, on recueille un demi-verre de salive. Très sale, celle-ci est filtrée sur papier filtre très mince. Elle passe rapidement, encore trouble, mais débarrassée des plus gros débris végétaux qui l'encombraient.

On inocule deux cobayes, S. 1 et S. 2, avec 2 c. c. de ce filtrat.

Avec 1/4 de c. c. de sang, on inocule un cobaye témoin.

Le témoin présente des parasites six jours, et meurt vingt-trois jours après la contamination. S. 1 et S. 2 n'ont rien présenté, sauf de l'œdème aux points d'inoculation, dû aux impuretés du liquide.

S. 1, réinoculé le 11 décembre avec 1/2 c. c. de la jument 28 parasitée, laisse voir des parasites le 16 décembre (5 jours après l'inoculation) et meurt le 5 janvier (25 jours).

S. 2, inoculé le 20 octobre 1906, avec 3 gouttes du sang du lapin n° IV

1. *Bulletin, Inst. Pasteur*, IV, p. 668.

(virus bœuf Nguyen Duoc), présente des parasites le 1^{er} novembre (après 44 jours d'incubation) et meurt le 4 décembre (en 46 jours).

La salive n'avait ni contaminé ni immunisé les cobayes S. 1 et S. 2.

Action de la chaleur et de la lumière solaire. — Ayant pu constater le peu de sensibilité des cobayes sains à l'action du soleil tropical, nous avons voulu voir l'action que pourraient avoir la lumière et la chaleur sur des animaux surrétés.

Le 20 octobre, trois cobayes, C. 1 et C. 2, et C'. 1. reçoivent chacun 2 c. c. de sang d'un chien présentant à ce moment de nombreux parasites. Les animaux C furent mis dans une cage grillagée sur les quatre faces, recouverte d'un toit ne débordant pas, exposée au soleil devant un mur blanc. Les animaux recevaient les rayons directs de l'astre, de 6 heures du matin à 10 heures, et de 2 à 5 heures du soir.

Le cobaye C'. 1 fut laissé à l'ombre, dans un bâtiment où ne pénétrait que la lumière diffuse. Il montra des parasites trois jours, et mourut treize jours après l'inoculation.

Ceux exposés au soleil eurent dès le début une très forte hyperthermie (40°, 40° 5). Ils montrèrent des parasites après quatre et six jours d'incubation et moururent 24 et 32 jours après le début de l'expérience.

Ce sont là de trop légères différences pour que l'on puisse conclure à une action. Des cobayes inoculés dans les conditions ordinaires peuvent en montrer de plus fortes.

Trypanosomes et Septicémie microbienne. — Massaglia¹ dit qu'« une septicémie microbienne intercurrente (par exemple à streptocoques) fait disparaître les trypanosomes du sang. »

Nous avons pu vérifier le fait pour la bactériémie charbonneuse.

Le 30 août 1906, une chienne annamite de 2 ans reçoit 5 gouttes de sang du cobaye n° 2 (virus de Ban Don) contenant un trypanosome pour 6 champs.

Le 4 septembre : on voit les trypanosomes pour la première fois.

Le 10 : parasites très nombreux (5-6 par champ).

Le 14 : trypanosomes peu nombreux (4 pour trois champs). La chienne meurt le 16, à huit heures du soir. Les trypanosomes ne sont plus trouvés dans le sang, où pullulent des bactéries.

Quelques jours auparavant, un de nos bœufs de voiture était mort spontanément de charbon. Quelques animaux d'expérience avaient été inoculés et avaient succombé. L'indigène chargé de nourrir la chienne avait manié ces cadavres.

1. *Loc. cit.*

Le chien anamite offre au charbon la même résistance que les animaux de race européenne. L'infection de Surra avait aboli cette résistance.

CONCLUSIONS

a. — Il semble que les épizooties à trypanosomes de l'Indo-Chine soient causées par le même parasite.

b. — Les parasites provenant des différents foyers de Surra peuvent présenter de notables variations d'activité.

Ces variations sont attribuables à la « généalogie » des parasites.

c. — Le buffle n'est pas vacciné par une première atteinte de Surra, et peut, au moins à deux reprises, être porteur de parasites virulents sans paraître malade.

On trouve des bœufs infectés en dehors de toute épizootie.

Le rôle des bovins et bubalins apparaît primordial dans la propagation du Surra.

La prophylaxie de cette affection peut donc se résumer ainsi :

1° Lutte contre les agents de transmission : drainages, déboisement, faucardement des cours d'eau, protection mécanique des écuries. Choix des terrains de pâture ;

2° Éloignement des équidés du réservoir de virus, — buffles et bœufs, — et dans les écuries et au pâturage ;

3° En attendant un agent curateur efficace, abatage des malades. Dépister les cas latents par la concentration en *lieu choisi* (à l'abri des taons) des animaux exposés à la contagion, par des prises de température, des examens de sang, des inoculations au rat.

d. — L'albuminurie semble constante au moment des « crises ».

e. — La salive des chevaux malades ne paraît pas virulente quand elle n'est pas souillée de sang.

f. — La chaleur et la lumière solaire ne semblent pas avoir

d'action modificatrice nette, en aucun sens, sur l'évolution du Surra.

g. — Les septicémies microbiennes (fièvre charbonneuse) font disparaître les trypanosomes.

Nhatrang, mars 1907.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire.